



#7

1c971 U.S. PRO  
10/067449  
02/05/02

## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 101 06 718.6

**Anmeldetag:** 14. Februar 2001

**Anmelder/Inhaber:** Aventis Pharma Deutschland GmbH,  
Frankfurt am Main/DE

**Bezeichnung:** Hefestamm von *Saccharomyces cerevisiae*  
mit funktioneller Expression eines Glut-  
Transporters

**IPC:** C 12 N, C 12 Q, C 07 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 04. Oktober 2001  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
Der Präsident  
Im Auftrag

Wibinger

## Beschreibung

- 5 Hefestamm von *Saccharomyces cerevisiae* mit funktioneller Expression eines Glut-Transporters

Die Erfindung betrifft einen Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher durch Deletion der genomischen Sequenzen keine Hexosetransporter mehr  
10 ausbildet und in Folge dessen sich auf Substraten mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann, wobei dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren wiederhergestellt wird, wenn er ein GLUT4-Gen zur Expression bringt.

- 15 Die meisten heterotrophen Zellen transportieren Glukose über spezielle Transporterproteine ins Zellinnere. Bei den verschiedenen Organismen haben sich unterschiedliche Mechanismen herausgebildet, die den Glukosetransport vermitteln, also Protonen-Symportsysteme,  $\text{Na}^+$ -Glukosecotransporter, bindungsproteinabhängige Systeme, Phosphotransferasesysteme sowie Systeme  
20 für die erleichterte Diffusion. Bei den Eukaryonten vermittelt eine Familie von Glukosetransportern, die bei Säugetieren von den *GLUT*-Genen und bei *Saccharomyces cerevisiae* von den *HXT*-Genen codiert werden, die Glukoseaufnahme über erleichterte Diffusion. Diese Transporter zählen zu einer  
größeren Zuckertransport-Superfamilie und sind durch das Vorliegen 12  
25 transmembranöser Helices und mehrerer konservierter Aminosäurereste und – motive gekennzeichnet.

- Der Glukosetransport bei Säugetieren war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, da die Kenntnis der Vorgänge bei Krankheiten, die mit einer defekten Glukosehomöostase assoziiert sind, wie zum Beispiel Diabetes mellitus oder  
30 Fanconi-Bickel-Syndrom, von großer Wichtigkeit ist. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind acht Glukosetransporter (GLUT1 bis GLUT5, GLUT8, GLUT9/SLC2A9, GLUT9 (GenBank Aufnahme-Nr. Y17803)) identifiziert worden, welche zur erleichterten Glukoseaufnahme beitragen. Zu den Schlüsselrollen dieser Transporter zählen die Aufnahme von Glukose in verschiedene Gewebe, ihre

Speicherung in der Leber, ihre insulinabhängige Aufnahme in die Muskelzellen und Adipozyten sowie die Glukose-Messung durch die  $\beta$ -Zellen des Pankreas.

GLUT1 vermittelt den Glukosetransport in die Erythrozyten und durch die Blut-Hirn-Schranke, wird jedoch auch in vielen anderen Geweben exprimiert, während GLUT4

- 5 auf insulinabhängige Gewebe, in erster Linie auf Muskel- und Fettgewebe beschränkt ist. Bei diesen insulinabhängigen Geweben stellt die Kontrolle des Targeting von GLUT4-Transportern in intrazelluläre Kompartimente oder Plasmamembran-kompartimente einen wichtigen Mechanismus für die Regulierung der Glukoseaufnahme dar. In Gegenwart von Insulin wird intrazelluläres GLUT4 auf
- 10 die Plasmamembran zurückverteilt, um die Glukoseaufnahme zu erleichtern. GLUT1 wird in diesen insulinabhängigen Geweben ebenfalls exprimiert, und seine Verteilung in der Zelle wird ebenfalls von Insulin beeinflusst, jedoch weniger stark. Darüberhinaus wird die relative Wirksamkeit, mit der GLUT1 oder GLUT4 den Zuckertransport katalysieren, nicht nur von dem Ausmaß des Targetings jedes
- 15 Transporters an die Zelloberfläche bestimmt, sondern auch von ihren kinetischen Eigenschaften.

- Die Tatsache, daß unterschiedliche Glukosetransporter-Isoformen koexprimiert werden sowie der rasche Glukosemetabolismus hat Untersuchungen bezüglich der Rolle und der genauen Eigenschaften jeder Glukosetransporter-Isoform in diesen
- 20 insulinabhängigen Geweben kompliziert gestaltet. Um diese Probleme zu lösen, wurden heterologe Expressionssysteme wie *Xenopus*-Oozyten, Gewebekulturzellen, Insektenzellen und Hefezellen verwendet. Es stellte sich jedoch heraus, daß Schwierigkeiten bei diesen Systemen auftraten: zu schwache Aktivität der heterolog exprimierten Transporter, eigene Glukosetransporter bei diesen Systemen, die
- 25 intrazelluläre Retention eines beträchtlichen Teils der Transporter, oder sogar die Produktion inaktiver Transporter.

- Bislang ist noch kein Organismus bekannt, der außer einem heterologen und funktionellen Glut4-Glukosetransportprotein kein weiteres insbesondere
- 30 intrinsisches Hexosetransportprotein exprimiert. Dies führt zu einer Reihe von Nachteilen bei der Suche nach Verbindungen, welche die Transporteigenschaften des Glut4-Proteins verändern können. Solche Verbindungen wären von großem Interesse als Bestandteile von Arzneimitteln, da bekannt ist, daß Glut4 bei der

Absenkung der Blutglukosekonzentration im Zusammenspiel mit Insulin und anderen Faktoren eine wichtige Rolle spielt. Mit Hilfe eines Organismus, der ein funktionelles Glut4-Transportprotein exprimiert, hätte man die Möglichkeit nach Verbindungen zu suchen, die den Glut4-Transporter direkt beeinflussen. Die Nebenwirkungen solcher Verbindungen wären geringer, da keine Nebeneffekte vermittelt über Signalfaktoren auftreten würden. Außerdem wären die Handhabung und Bereitstellung des Materials im Falle eines zur Verfügung stehenden Hefestammes sehr erleichtert. Als Aufgabe der Erfindung wird deshalb die Bereitstellung eines Hefestammes angesehen, der ein funktionelles Glut4-Protein exprimiert.

10

Die Erfindung betrifft einen Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher sich auf Substraten mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann, wobei dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren wiederhergestellt wird, wenn er ein GLUT4-Gen zur Expression bringt. Solch ein Stamm kann beispielsweise durch Mutation oder Deletion der entsprechenden genomischen Sequenzen hergestellt werden. Hexosen soll als Bezeichnung für Aldosen mit 6 Kohlenstoffatomen wie Glukose, Galaktose oder Mannose sowie für Ketosen mit 6 Kohlenstoffatomen wie Fruktose oder Sorbose verwendet werden.

20

Die Erfindung betrifft weiterhin einen Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wie eben beschrieben, wobei dieser Stamm ein GLUT4-Gen enthält.

25

Bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sind 17 Hexosetransporter und zusätzlich drei Maltosetransporter bekannt, die, sofern sie stark genug exprimiert werden, in der Lage sind, Hexosen in die Hefe zu transportieren. Bekannt ist ein Stamm, dem durch Deletion sämtliche Transporter, die zur Hexoseaufnahme geeignet sind, entfernt wurden. Dieser Stamm enthält lediglich noch die beiden Gene MPH2 und MPH3, die zu Maltosetransportproteinen homolog sind. Die beiden Gene MPH2 und MPH3 werden bei Anwesenheit von Glukose im Medium reprimiert. Herstellung und Charakterisierung dieses Hefestammes ist in Wieczorke et al., FEBS Lett. 464, 123 – 128 (1999) beschrieben. Dieser Stamm ist nicht in der Lage, sich auf einem Substrat mit einer Glukose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren. Aus diesem Stamm können Mutanten selektiert werden, die ausgehend von einem

30

entsprechenden Vektor Glut1 funktionell exprimieren (Stamm hxt fgy1-1).

Transformiert man in den Hefestamm hxt fgy1-1 einen Plasmidvektor, welcher ein GLUT4-Gen unter Kontrolle eines Hefepromotors trägt, wird dennoch nur sehr wenig Glukose transportiert. Die funktionelle Expression von Glut4 erfordert weitere

5 Anpassungen dieses Hefestammes, um einen signifikanten Glukosetransport mittels Glut4 zu ermöglichen. Solche Hefestämme, die Glukose mittels eines einzigen Glukosetransporters Glut4 in die Zellen aufnehmen, lassen sich auf Substraten mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle isolieren. Dazu wird ein Hefestamm hxt fgy1-1 der ein Glut4-Gen unter funktioneller Kontrolle eines Hefepromotors trägt,

10 transformiert. Diese so transformierten Hefezellen werden auf einem Nährmedium ausgebracht, welches Glukose als einzige Kohlenstoffquelle enthält, und werden darauf inkubiert. Nach einigen Tagen der Inkubation bei beispielsweise 30°C

beobachtet man Wachstum von vereinzelt Kolonien. Eine dieser Kolonien wird isoliert. Entfernt man aus dieser Kolonie das Hefeplasmid, unterbleibt die

15 Vermehrung auf dem Nährmedium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle. Wird diesem Stamm, der nun kein Vektorplasmid mehr enthält, wiederum ein Hefevektor, der ein GLUT4-Gen unter funktioneller Kontrolle eines Hefepromotors trägt, durch Transformation zugeführt, dann ist dieser Stamm wiederum in der Lage, sich auf einem Medium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren. Die

20 Herstellung eines Stammes von *Saccharomyces cerevisiae*, welcher die Glukoseaufnahme mittels eines Glut4-Transporters ermöglicht, wird in den Beispielen ausführlich beschrieben. Dieser Stamm exprimiert keine hefeeigenen Transporter für Hexosen und ist in der Lage mittels eines beispielsweise durch Transformation eingeführten Gens für einen Glut4-Transporter Hexosen

25 insbesondere Glukose in die Zelle aufzunehmen. Hefestämme mit dieser Eigenschaft wurden unter der Nummer DSM 14035, DSM 14036 oder DSM 14037 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, (DSMZ) in Braunschweig gemäß dem Budapester Vertrag über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke von

30 Patentverfahren hinterlegt (Tabelle 1).

In einer bevorzugten Ausführungsform des Stammes von *Saccharomyces cerevisiae* dieser Erfindung wird ein GLUT4-Gen unter funktioneller Kontrolle eines

Expressions promotors für Hefen zur Expression gebracht. Geeignete Expressions promotoren der Hefe sind dem Fachmann bekannt. Solche sind beispielsweise der SOD1-Promotor (Superoxiddismutase), ADH-Promotor (Alkoholdehydrogenase), der Promotor für das Gen der sauren Phosphatase, HXT2-Promotor (Glukosetransporter 2), HXT7-Promotor (Glukosetransporter 7), GAL2-Promotor (Galaktosetransporter) und andere. Das Konstrukt bestehend aus einem Expressionspromotor einer Hefe und einem GLUT4-Gen ist für den Zweck der Expression Bestandteil eines Hefevektors. Dieser Hefevektor kann zur Durchführung der Expression als selbstreplizierendes Partikel unabhängig vom Genom der Hefe vorliegen oder stabil in das Genom der Hefe integriert sein. Als Hefevektor eignet sich grundsätzlich jede Polynukleotidsequenz, welche in einer Hefe vermehrt werden kann. Als Hefevektoren können insbesondere Hefepiasmide oder künstliche Hefechromosomen (Yeast Artificial Chromosomes) verwendet werden. Hefevektoren enthalten in der Regel einen „origin of replication“ ( $2\mu$ , ars) für die Einleitung der Replikation sowie einen Selektionsmarker, der üblicherweise aus einem Auxotrophiemarker oder einem Antibiotikumresistenzgen besteht. Einem Fachmann als Hefevektoren bekannt sind beispielsweise pBM272, pCS19, pEMBCYe23, pFL26, pG6, pNN414, pTV3 oder andere. Grundsätzlich kann das GLUT4-Gen jeder Spezies zur Expression gebracht werden. Bevorzugt wird ein GLUT4-Gen aus Mensch, Maus oder Ratte zur Expression gebracht. Die Polynukleotid- und Aminosäuresequenzen für Glut4 sind zugänglich beispielsweise über folgende Einträge in Genbank: M20747 (cDNA; Mensch), EMBL:D28561 (cDNA; Ratte), EMBL:M23382 (cDNA; Maus), Swissprot:P14672 (Protein; Mensch), Swissprot:P19357 (Protein; Ratte) und Swissprot:P14142 (Protein; Maus). Besonders bevorzugt wird das GLUT4-Gen mittels des Vektors YEp4H7-HsGlut4 (SEQ ID Nr. 9) zur Expression gebracht. Das GLUT4-Gen dieses Vektors ist menschlichen Ursprungs. Die Herstellung eines Hefevektors enthaltend ein GLUT4-Gen zur Expression in Zellen ist dem Fachmann geläufig. In den Beispielen wird die Herstellung solch eines Vektors beschrieben. Ein Hefevektor enthaltend ein Gen zur Expression wird, damit es zur Expression gebracht werden kann, durch Transformation in die Hefe eingeführt. Dazu eignen sich beispielsweise Methoden wie die Elektroporation oder die Inkubation kompetenter Zellen durch Vektor-DNA. Die Transformation ist eine dem Fachmann geläufige Technik zur Einführung von

Fremd-DNA insbesondere von Plasmiden oder Vektoren in Mikroorganismen wie Hefen oder Bakterien. In der einem Fachmann bekannten Methodensammlung „Methods in Yeast Genetics, 1997: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual; Adams Alison (Edt.); Cold Spring Harbor Laboratory; ISBN: 0-87969-508-0“ finden

5. sich ausführliche Protokolle zu Transformation von Hefen, Hefevektoren, Selektion von Mutanten der Hefe oder die Expression von Proteinen in Hefen. Der Nachweis erfolgter Expression des GLUT4-Gens in einer Hefe dieser Erfindung kann insbesondere durch Northern-Blotting, Western-Blotting, Glukoseaufnahmestudien sowie Glukoseverwertungsstudien oder andere Methoden geführt werden. Beim

10 Northern-Blotting wird isolierte RNA des zu untersuchenden Organismus auf einen Träger wie beispielsweise Nitrozellulose aufgebracht und fixiert, sowie anschließend durch Inkubation dieses mit der RNA des Organismus versehenen Trägers mit radioaktiv oder über einen Fluoreszenzfarbstoff markierter DNA einer GLUT4-Polynukleotidsequenz detektiert. Die Expression von GLUT4-mRNA in einer

15 Hefe dieser Erfindung erkennt man am Auftreten geschwärzter Banden. Im Vergleich dazu können mit der RNA einer sonst gleichen Hefe, die aber nicht mit einem GLUT4-haltigen Expressionsvektor transformiert wurde, keine geschwärzten Banden nachgewiesen werden. Beim Western-Blotting erfolgt der Nachweis des exprimierten Proteins nach Aufbringen eines Proteinextrakts des zu untersuchenden Organismus

20 auf einen Membranträger wie Nitrozellulose über Antikörper. Antikörper für das Glut4-Protein sind beispielsweise erhältlich von Alpha Diagnostic International, Inc., 5415 Lost Lane, San Antonio, TX 78238 USA. Über diesen Anbieter können auch die zum Nachweis des gebundenen Antikörpers erforderlichen Testsysteme bezogen werden. Der Nachweis des exprimierten Glut4-Proteins wird im Vergleich

25 zu einem sonst gleichen Hefestamm geführt, der kein Glut4-Protein enthält. Bei Glukoseaufnahmestudien wird dem zu untersuchenden Organismus radioaktiv markierte Glukose als einzige Kohlenstoffquelle angeboten. Die Hefe mit Glut4 als einzigem Glukosetransporter nimmt im Gegensatz zu einem sonst gleichen Kontrollstamm, der keinen Glut4 Transporter enthält, diese radioaktiv markierte

30 Glukose ins Zellinnere auf. Die Glukoseverwertung kann auf Nährmedien getestet werden, die Glukose als einzige Kohlenstoffquelle enthalten. Der Hefestamm mit einem Glut4-Transportprotein als einzigem Glukosetransporter ist im Unterschied zur sonst gleichen Kontrolle ohne Glut4-Transporter in der Lage, sich im Nährmedium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren. Diese eben erwähnten

Methoden sind dem Fachmann geläufig. Ausführliche Beschreibungen finden sich beispielsweise in „Current Protocols in Molecular Biology; Edited by: F.M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. m. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl; published by: John Wiley & Sons; 2000 (currently updated)".

5

Die Erfindung betrifft bevorzugt einen Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wobei ein Glut4-Gen aus Mensch, Maus oder Ratte zur Expression gebracht wird.

10

Die Erfindung betrifft besonders bevorzugt einen Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wobei eine Polynukleotidsequenz enthaltend einen codierenden Bereich eines menschlichen Glut4-Gens zur Expression gebracht wird.

15

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform bezieht sich die Erfindung auf einen oder mehrere der Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher beispielsweise unter dem Aktenzeichen DSM 14038, DSM 14039 oder DSM 14040 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig hinterlegt wurden. Diese Stämme sind in Tabelle 1 aufgelistet. Diese Liste enthält die Angaben zu den verwendeten Hefestämmen, in welche die Plasmide transformiert wurden, den Plasmiden sowie den Anzuchtbedingungen für diese Hefen.

20

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Herstellung eines Stammes der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* dieser Erfindung erhältlich durch folgende Verfahrensschritte:

25

a) Bereitstellung einer Hefe, die sich auf Substraten mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann;

b) Transformation der Hefe aus a) durch ein Plasmid, welches ein GLUT4-Gen umfaßt, welches unter funktioneller Kontrolle eines in Hefe exprimierbaren Promotors steht;

30

c) Ausbringen eines Stammes nach Transformation gemäß b) auf einem Medium, welches eine Hexose als einzige Kohlenstoffquelle enthält;

d) Selektion eines Stammes nach Ausbringen gemäß c), der sich auf diesem Medium vermehrt und der die Hexoseaufnahme mittels des Glut-4 Gens unterstützt.

Die Erfindung betrifft ebenso die Vermehrung eines solchen Stammes.



Zur Bereitstellung einer Hefe dieser Erfindung wird in einem ersten Schritt ein Stamm einer Hefe *Saccharomyces cerevisiae* isoliert, welcher sich auf Substraten mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann, wobei dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger

5 Kohlenstoffquelle zu vermehren wiederhergestellt wird, wenn er ein Glut4-Gen, zur Expression bringt. Dies kann durch Mutation oder Deletion der entsprechenden genomischen Sequenzen, welche für die Hexosetransporter codieren, geschehen. Die Bereitstellung erfordert weiterhin die Vermehrung dieser Hefe. Die Vermehrung erfolgt mittels Standardmethoden der Mikrobiologie in geeigneten Medien.

10 Geeignete Medien zur Vermehrung einer Hefe sind beispielsweise Vollmedien insbesondere YPD-Medium (Yeast extract/Peptone/Dextrose-Medium) oder selektive Medien und andere. Die Hefe-Zellen werden in diesen Nährmedien vermehrt, nach der Vermehrung durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt und für die Zwecke des Verfahrens in einem wäßrigen Lösungsmittel enthaltend unter  
15 anderem Puffersubstanzen, Salze oder andere Zusätze in eine wäßrige Suspension gebracht. Angaben zu Vermehrung von Hefen findet der Fachmann im bereits erwähnten „Methods in Yeast Genetics, 1997: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual; Adams Alison (Edt.); Cold Spring Harbor Laboratory; ISBN: 0-87969-508-0“.

20

In einer bevorzugten Ausführungsform der Herstellung eines Stammes der Hefe wie vorstehend beschrieben wird zur Transformation ein GLUT4-Gen, welches unter funktioneller Kontrolle eines in Hefe exprimierbaren Promotors steht, verwendet. Zur Durchführung der Transformation sei auf das vorstehend bereits erwähnte

25 „Methods in Yeast Genetics“ verwiesen.

Besonders bevorzugt für die Herstellung wird zur Transformation ein GLUT4-Gen aus Mensch, Maus oder Ratte verwendet. Weiterhin besonders bevorzugt wird zur Transformation ein GLUT4-Gen enthalten in einer Polynukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 9 oder 10 verwendet. SEQ ID Nr. 9 offenbart die Polynukleotidsequenz

30 des Hefevektors Yep4H7-HsGLUT4. Dieser Vektor enthält eine Polynukleotidsequenz unter funktioneller Kontrolle des HXT7-Promotors, welche für die Aminosäuresequenz des menschlichen GLUT4-Gens codiert. In SEQ ID Nr. 10 ist die Polynukleotidsequenz des Vektors H2rg4g2 enthalten. Das Hefeplasmid H2rg4g2 trägt ein GLUT4-Gen der Ratte unter funktioneller Kontrolle eines HXT2-

Promotors. Funktionelle Kontrolle des GLUT4-Gens durch den Promotor bedeutet, daß mittels des Promotors eine mRNA transkribiert wird, die in ein Glut4-Protein translatiert werden kann. Bezüglich der Offenbarungen der GLUT4-Sequenzen und der verwendeten Methoden sei auf das bereits vorstehend ausgeführte hierzu

5 verwiesen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut4-Proteins transportiert wird , vermehrt oder vermindert enthaltend folgende Verfahrensschritte:

- 10 a) Bereitstellung eines Stammes der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* dieser Erfindung, der ein GLUT4-Gen exprimiert;
- b) Bestimmung der Menge einer Hexose, die von diesem aufgenommen wird;
- c) Bereitstellung einer Verbindung;
- d) In-Kontakt-Bringen eines Stammes der Hefe bereitgestellt gemäß a) mit einer
- 15 Verbindung bereitgestellt gemäß c)
- e) Bestimmung der Menge einer Hexose, die in den Stamm der Hefe nach In-Kontakt-Bringen gemäß d) aufgenommen wird;
- f) Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut4-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert, durch Vergleich der in
- 20 den Stamm aufgenommenen Menge der Hexose vor und nach In-Kontakt-Bringen gemäß d), die gemäß b) und e) bestimmt wird.

Zur Bereitstellung einer Hefe dieser Erfindung wird in einem ersten Schritt ein Stamm einer Hefe *Saccharomyces cerevisiae* isoliert , welcher sich auf Substraten mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann, wobei

25 dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren wiederhergestellt wird, wenn er ein GLUT4-Gen zur Expression bringt. Dieser Hefestamm wird mittels eines Hefevektors transformiert, der ein GLUT4-Gen unter funktioneller Kontrolle eines Hefepromotors enthält. Die

30 Herstellung eines solchen Stammes der Hefe ist in den Beispielen beschrieben. Die Bereitstellung erfordert weiterhin die Vermehrung dieser Hefe. Die Vermehrung erfolgt mittels Standardmethoden der Mikrobiologie in geeigneten Medien. Geeignete Medien zur Vermehrung einer Hefe sind beispielsweise Vollmedien insbesondere YPD-Medium (Yeast extract/Peptone/Dextrose-Medium) oder

selektive Medien und andere. Die Hefe-Zellen werden in diesen Nährmedien vermehrt, nach der Vermehrung durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt und für die Zwecke des Verfahrens in einem wäßrigen Lösungsmittel enthaltend unter anderem Puffersubstanzen, Salze oder andere Zusätze in eine wäßrige Suspension gebracht. Angaben zu Vermehrung von Hefen findet der Fachmann im bereits

5 erwähnten „Methods in Yeast Genetics, 1997: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual; Adams Alison (Edt.); Cold Spring Harbor Laboratory; ISBN: 0-87969-508-0“.

- 10 Die Bestimmung der Menge einer Hexose, die von einem wie eben vorstehend beschrieben bereitgestellten Hefestamm aufgenommen wird, kann mittels Aufnahmestudien mit radioaktiv markierter Glukose erfolgen. Dazu wird eine bestimmte Menge der Hefezellen beispielsweise eine Menge von 60 mg Naßgewicht pro ml in beispielsweise 100 µl eines Puffers suspendiert und mit einer definierten
- 15 Menge von  $^{14}\text{C}$ - oder  $^3\text{H}$ - markierter Glukose als einziger Kohlenstoffquelle versetzt. Man inkubiert die Zellen und entnimmt zu bestimmten Zeiten definierte Mengen der Zellen. Die Bestimmung der aufgenommenen Menge an Glukose erfolgt mit Hilfe von LSC (Liquid Scintillation Counting = Flüssig-Szintillationszählung). Die Bestimmung der Menge einer Hexose, die von einem wie eben vorstehend
- 20 beschrieben bereitgestellten Hefestamm aufgenommen wird, kann aber auch mittels Wachstumstests auf Medien mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle erfolgen. Dazu bestimmt man die Wachstumsrate des Stammes nach Zugabe der Verbindung beispielsweise durch regelmäßige Messungen der optischen Dichte der Kultur bei 600 nm und vergleicht diesen Wert mit der Wachstumsrate eines
- 25 Kontrollstammes (z.B. Wildtyphefestamm).

- Die Bereitstellung einer Verbindung erfolgt insbesondere durch chemische Synthese oder Isolierung chemischer Stoffe aus biologischen Organismen. Die chemische Synthese kann auch automatisiert erfolgen. Die durch Synthese oder Isolierung
- 30 gewonnenen Verbindungen können in einem geeigneten Lösungsmittel in Lösung gebracht werden. Geeignete Lösungsmittel sind insbesondere wäßrige Lösungen, welche einen bestimmten Anteil eines organischen Lösungsmittels wie zum Beispiel DMSO (Dimethylsulfoxid) enthalten.

Das In-Kontakt-Bringen eines Stammes der Hefe mit einer Verbindung zur Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut4-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert, erfolgt insbesondere in dafür vorgesehenen Vorrichtungen eines Laborroboters. Solche Vorrichtungen können aus speziell präparierten Kammern mit Vertiefungen, aus Mikrotiterplatten, Eppendorfgläsern oder Laborgläsern bestehen. Laborroboter sind in aller Regel auf hohe Durchsatzraten konzipiert. Ein Verfahren wie das vorstehend genannte ausgeführt mit Hilfe eines Laborroboters wird deshalb auch HTS (High Throughput Screening) genannt.

10

Nach In-Kontakt-Bringen der Hefe mit der Verbindung wird die Menge einer Hexose insbesondere von Glukose, die unter diesen Bedingungen von der Hefezelle ins Zellinnere befördert wird, bestimmt. Dazu kann man sich desselben Vorgehens bedienen, das bereits zur Bestimmung der Glukoseaufnahme für einen Stamm, der nicht mit einer Verbindung in Kontakt gebracht wurde, beschrieben wurde.

15

Die Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut4-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert, erfolgt durch Vergleich der in den Stamm aufgenommenen Menge der Hexose vor und nach In-Kontakt-Bringen mit der Verbindung.

20

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Arzneimittel enthaltend eine Verbindung, welche durch das soeben beschriebene Verfahren unter Verwendung des Glut4 Gens identifiziert und gegebenenfalls weiterentwickelt wurde, sowie Hilfsstoffe zur

25

Formulierung des Arzneimittels für die Behandlung von Diabetes oder Übergewichtigkeit. Die Weiterentwicklung einer Verbindung, welche identifiziert wurde, bedeutet, daß zum einen die Spezifität hinsichtlich des Zielproteins, hier Glut4, verbessert wird, daß weiterhin die Verfügbarkeit im tierischen oder menschlichen Organismus erhöht wird sowie daß eventuell bestehende unerwünschte Nebenwirkungen vermindert werden. Dafür stehen dem Fachmann eine Reihe von Methoden zur Verfügung, von denen beispielhaft aber nicht abschließend die Verwendung pharmakologischer Tiermodelle wie der Zucker-Ratte oder ob/ob Maus, der Einsatz biochemischer in vitro Messungen, die Verwendung von virtuellen Strukturmodellen von Verbindungen und dem Glut4 Protein genannt

30

seien. Hilfsstoffe zur Formulierung eines Arzneimittels ermöglichen die Zubereitung der wirksamen Substanz mit dem Ziel, eine auf die jeweilige Anwendung optimal abgestimmte Ausbringung, Verteilung und Entfaltung des Wirkstoffes zu ermöglichen. Solche Hilfsstoffe sind beispielsweise Füll-, Binde-, Spreng-, oder

- 5- Gleitmittel wie Lactose, Saccharose, Mannit, Sorbit, Cellulose, Stärke, Dicalciumphosphat, Polyglykole, Alginate, Polyvinylpyrrolidon, Carboxymethylcellulose, Talkum oder Siliciumdioxid.

Diabetes oder Zuckerkrankheit äußert sich durch Ausscheidung von Glukose mit dem Harn bei krankhafter Erhöhung des Blutglukosespiegels (Hyperglycämie)

- 10 aufgrund einer chronischen Stoffwechselstörung, die auf Mangel an Insulin oder herabgesetzter Insulinwirkung beruht. Die fehlende oder reduzierte Insulinwirkung führt zu mangelhafter Resorption und Verwertung der ins Blut aufgenommenen Glukose durch die Körperzellen. Im Fettgewebe kommt es unter der Einwirkung Insulin-antagonistischer Hormone zur gesteigerten Lipolyse mit Erhöhung der freien
- 15 Fettsäuren im Blut.

Bei der Fettleibigkeit (Adipositas, Obesitas) handelt es sich um abnorme Gewichtszunahme aufgrund einer gestörten Energiebilanz durch übermäßige Kalorienaufnahme , die ein Gesundheitsrisiko beinhaltet.

- 20 Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung einer Verbindung, welche durch ein Verfahren unter Verwendung des Glut4 Proteins identifiziert und gegebenenfalls weiterentwickelt wurde, zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Diabetes oder Übergewichtigkeit. Arzneimittel sind Darreichungsformen pharmakologisch aktiver Substanzen zur Therapie von Krankheiten oder körperliche

- 25 Fehlfunktionen bei Mensch und Tier. Für die orale Therapie kennt man beispielsweise Pulver, Granulate, Tabletten, Pillen, Pastillen, Dragees, Kapseln, flüssige Extrakte, Tinkturen, Sirup. Für eine äußerliche Anwendung verwendet man beispielsweise Aerosole, Sprays, Gele, Salben oder Puder. Eine parenterale Anwendung ist möglich mit Injektions- oder Infusionslösungen mit Ampullen,
- 30 Flaschen oder Spritzampullen. Dem Fachmann der pharmazeutischen Technologie (Galenik) sind diese und andere Arzneimittel bekannt.

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut1-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert, enthaltend folgende Verfahrensschritte:

- a) Bereitstellung eines Stammes der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher sich auf Substraten mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann, und dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren wiederhergestellt wird, wenn er ein GLUT1-Gen zur Expression bringt, wobei dieser Stamm ein GLUT1 Gen enthält, welches unter funktioneller Kontrolle eines in Hefe exprimierbaren Promotors steht.
- b) Bestimmung der Menge einer Hexose, die in diesen Stamm bereitgestellt gemäß a) aufgenommen wird;
- c) Bereitstellung einer Verbindung;
- d) In-Kontakt-Bringen eines Stammes der Hefe bereitgestellt gemäß a) mit einer Verbindung bereitgestellt gemäß c)
- e) Bestimmung der Menge einer Hexose, die in den Stamm der Hefe nach In-Kontakt-Bringen gemäß d) aufgenommen wird;
- f) Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut1-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert, durch Vergleich der in den Stamm aufgenommenen Menge der Hexose vor und nach In-Kontakt-Bringen gemäß d), die gemäß b) und e) bestimmt wird.

Zur Bereitstellung einer Hefe dieser Erfindung wird in einem ersten Schritt ein Stamm einer Hefe *Saccharomyces cerevisiae* isoliert, welcher durch Deletion der genomischen Sequenzen keine Hexosetransporter mehr ausbildet und in Folge dessen sich auf Substraten mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann, wobei dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren wiederhergestellt wird, wenn er ein GLUT1-Gen zur Expression bringt. Solche Stämme sind bei der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH unter der Nummer DSM 14031, DSM 14032 oder DSM 14034 hinterlegt.

Bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sind 17 Hexosetransporter und zusätzlich drei Maltosetransporter bekannt, die in der Lage sind, Hexosen in die Hefe zu transportieren. Bekannt ist ein Stamm, dem durch Deletion sämtliche Transporter,

die zur Hexoseaufnahme geeignet sind, entfernt wurden. Herstellung und Charakterisierung dieses Hefestammes ist in Wieczorke et al., FEBS Lett. 464, 123 – 128 (1999) beschrieben. Dieser Stamm ist nicht in der Lage, sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren.

- 5 Transformiert man in solch einen Hefestamm einen Plasmidvektor, welcher ein Glut1-Gen unter Kontrolle eines Hefepromotors trägt, wird dennoch keine Glukose transportiert. Die funktionelle Expression von Glut1 erfordert weitere Anpassungen dieses Hefestammes, um den Glukosetransport mittels Glut1 zu ermöglichen. Solche Hefestämme, die Glukose mittels eines einzigen Glukosetransporters Glut1
- 10 in die Zellen aufnehmen, lassen sich auf Substraten mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle isolieren. Dazu wird ein Hefestamm, der keine intakten Hexose transportierenden Proteine mehr exprimiert mit einem Hefevektor, der ein GLUT1-Gen unter funktioneller Kontrolle eines Hefepromotors trägt, transformiert. Diese so transformierten Hefezellen werden auf einem Nährmedium ausgebracht, welches
- 15 Glukose als einziger Kohlenstoffquelle enthält und werden darauf inkubiert. Nach einigen Tagen der Inkubation bei beispielsweise 30°C beobachtet man Wachstum von vereinzelter Kolonien. Eine dieser Kolonien wird isoliert. Entfernt man aus dieser Kolonie das Hefeplasmid, unterbleibt die Vermehrung auf dem Nährmedium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle. Wird diesem Stamm, der nun kein
- 20 Vektorplasmid mehr enthält, wiederum ein Hefevektor, der ein GLUT1-Gen unter funktioneller Kontrolle eines Hefepromotors trägt, durch Transformation zugeführt, dann ist dieser Stamm wiederum in der Lage, sich auf einem Medium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren.
- 25 Zur Transformation eines Hefestammes wird insbesondere ein GLUT1-Gen aus Mensch, Maus oder Ratte verwendet. Polynukleotidsequenzen und Aminosäuresequenzen für Glut1 sind offenbart unter den folgenden Code-Nummern der angegebenen Datenbanken: EMBL:M20653 (cDNA; Mensch), EMBL:M13979 (cDNA; Ratte), EMBL:M23384 (cDNA; Maus), Swissprot:P11166 (Protein; Mensch),
- 30 Swissprot:P11167 (Protein; Ratte), Swissprot:P17809 (Protein; Maus).

Die Herstellung eines solchen Stammes der Hefe ist in den Beispielen beschrieben.. Die Bereitstellung erfordert weiterhin die Vermehrung dieser Hefe. Die Vermehrung

erfolgt mittels Standardmethoden der Mikrobiologie in geeigneten Medien.

Geeignete Medien zur Vermehrung einer Hefe sind beispielsweise Vollmedien insbesondere YPD-Medium (Yeast extract/Peptone/Dextrose-Medium) oder selektive Medien. Die Hefe-Zellen werden in diesen Nährmedien vermehrt, nach der

- 5 Vermehrung durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt und für die Zwecke des Verfahrens in einem wäßrigen Lösungsmittel enthaltend unter anderem Puffersubstanzen, Salze oder andere Zusätze in eine wäßrige Suspension gebracht. Angaben zu Vermehrung von Hefen findet der Fachmann im bereits erwähnten „Methods in Yeast Genetics, 1997: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual; Adams Alison (Edt.); Cold Spring Harbor Laboratory; ISBN: 0-87969-508-0“.

In einer bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahren wird ein Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* bereitgestellt, der ein GLUT1 Gen unter funktioneller Kontrolle eines in Hefe exprimierbaren Promotors enthält. Solche für dieses

- 15 Verfahren geeignete Stämme wurden bei der Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH unter der Nummer DSM 14033, DSM 14026 oder DSM 14033 hinterlegt.

Ein GLUT1 Gen als Bestandteil eines Plasmids ist SEQ ID Nr. 11 oder SEQ ID Nr. 20 12 offenbart. SEQ ID Nr. 11 enthält die Sequenz des Hefevektors Yep4H7-HsGlut1. In diesem Plasmid ist die Polynukleotidsequenz eines menschlichen GLUT1 Gens enthalten, welches unter funktioneller Kontrolle eines HXT7-Promotors steht. SEQ ID Nr. 12 enthält die Polynukleotidsequenz des Hefevektors H2rg1g2. Dieses Plasmid enthält die Polynukleotidsequenz eines GLUT1-Gens der Ratte unter funktioneller

25 Kontrolle des HXT2-Promotors.

- Die Bestimmung der Menge einer Hexose, die von einem wie eben vorstehend beschrieben bereitgestellten Hefestamm aufgenommen wird, kann mittels Aufnahmestudien mit radioaktiv markierter Glukose erfolgen. Dazu wird eine
- 30 bestimmte Menge der Hefezellen beispielsweise eine Menge von 60 mg Naßgewicht in beispielsweise 100 µl eines Puffers suspendiert und mit einer definierten Menge von  $^{14}\text{C}$ - oder  $^3\text{H}$ - markierter Glukose als einziger Kohlenstoffquelle versetzt. Man inkubiert die Zellen und entnimmt zu bestimmten Zeiten definierte Mengen der



Zellen. Die Bestimmung der aufgenommenen Menge an Glukose erfolgt mit Hilfe von LSC(Liquid Scintillation Counting; = Flüssig Szintillationszählung).

Die Bereitstellung einer Verbindung erfolgt insbesondere durch chemische Synthese oder Isolierung chemischer Stoffe aus biologischen Organismen. Die chemische  
 5 Synthese kann auch automatisiert erfolgen. Die durch Synthese oder Isolierung gewonnenen Verbindungen können in einem geeigneten Lösungsmittel in Lösung gebracht werden. Geeignete Lösungsmittel sind insbesondere wäßrige Lösungen, welche einen bestimmten Anteil eines organischen Lösungsmittels wie zum Beispiel DMSO (Dimethylsulfoxid) enthalten.

10

Das In-Kontakt-Bringen eines Stammes der Hefe mit einer Verbindung zur Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut1-Proteins transportiert wird , vermehrt oder vermindert, erfolgt insbesondere in dafür vorgesehenen Vorrichtungen eines Laborroboters. Solche  
 15 Vorrichtungen können aus speziell präparierten Kammern mit Vertiefungen, aus Mikrotiterplatten, Eppendorfgefäßen oder Laborgläsern bestehen. Laborroboter sind in aller Regel auf hohe Durchsatzraten konzipiert. Ein Verfahren wie das vorstehend genannte ausgeführt mit Hilfe eines Laborroboters wird deshalb auch HTS (High Throughput Screening) genannt.

20

Nach In-Kontakt-Bringen der Hefe mit der Verbindung wird die Menge einer Hexose insbesondere von Glukose, die unter diesen Bedingungen von der Hefezelle ins Zellinnere befördert wird, bestimmt. Dazu kann man sich desselben Vorgehens bedienen, das bereits zur Bestimmung der Glukoseaufnahme für einen Stamm, der  
 25 nicht mit einer Verbindung in Kontakt gebracht wurde, beschrieben wurde.

30

Die Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut1-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert, erfolgt durch Vergleich der in den Stamm aufgenommenen Menge der Hexose vor und nach In-Kontakt-Bringen mit der Verbindung.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Arzneimittel enthaltend eine Verbindung, welche durch das soeben beschriebene Verfahren unter Verwendung des Glut1 Gens identifiziert und gegebenenfalls weiterentwickelt wurde, sowie Hilfsstoffe zur

Formulierung des Arzneimittels für die Behandlung von Diabetes oder Übergewichtigkeit. Die Weiterentwicklung einer Verbindung, welche identifiziert wurde, bedeutet, daß zum einen die Spezifität hinsichtlich des Zielproteins, hier Glut4, verbessert wird, daß weiterhin die Verfügbarkeit im tierischen oder

- 5 menschlichen Organismus erhöht wird sowie daß eventuell bestehende unerwünschte Nebenwirkungen vermindert werden. Dafür stehen dem Fachmann eine Reihe von Methoden zur Verfügung, von denen beispielhaft aber nicht abschließend die Verwendung pharmakologischer Tiermodelle wie der Zucker-Ratte oder ob/ob Maus, der Einsatz biochemischer in vitro Messungen, die Verwendung
- 10 von virtuellen Strukturmodellen von Verbindungen und dem Glut1 Protein genannt seien. Hilfsstoffe zur Formulierung eines Arzneimittels ermöglichen die Zubereitung der wirksamen Substanz mit dem Ziel, eine auf die jeweilige Anwendung optimal abgestimmte Ausbringung, Verteilung und Entfaltung des Wirkstoffes zu ermöglichen. Solche Hilfsstoffe sind beispielsweise Füll-, Binde-, Spreng-, oder
- 15 Gleitmittel wie Lactose, Saccharose, Mannit, Sorbit, Cellulose, Stärke, Dicalciumphosphat, Polyglykole, Alginate, Polyvinylpyrrolidon, Carboxymethylcellulose, Talkum oder Siliciumdioxid.

- Diabetes oder Zuckerkrankheit äußert sich durch Ausscheidung von Glukose mit dem Harn bei krankhafter Erhöhung des Blutglukosespiegels (Hyperglycämie)
- 20 aufgrund einer chronischen Stoffwechselstörung, die auf Mangel an Insulin oder herabgesetzter Insulinwirkung beruht. Die fehlende oder reduzierte Insulinwirkung führt zu mangelhafter Resorption und Verwertung der ins Blut aufgenommenen Glukose durch die Körperzellen. Im Fettgewebe kommt es unter der Einwirkung Insulin-antagonistischer Hormone zur gesteigerten Lipolyse mit Erhöhung der freien
- 25 Fettsäuren im Blut.

Bei der Fettleibigkeit (Adipositas, Obesitas) handelt es sich um abnorme Gewichtszunahme aufgrund einer gestörten Energiebilanz durch übermäßige Kalorienaufnahme, die ein Gesundheitsrisiko beinhaltet.

- 30 Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung einer Verbindung, welche durch ein Verfahren unter Verwendung des Glut1 Proteins identifiziert und gegebenenfalls weiterentwickelt wurde, zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Diabetes oder Übergewichtigkeit. Arzneimittel sind Darreichungsformen pharmakologisch aktiver Substanzen zur Therapie von Krankheiten oder körperliche

Fehlfunktionen bei Mensch und Tier. Für die orale Therapie kennt man beispielsweise Pulver, Granulate, Tabletten, Pillen, Pastillen, Dragees, Kapseln, flüssige Extrakte, Tinkturen, Sirup. Für eine äußerliche Anwendung verwendet man beispielsweise Aerosole, Sprays, Gele, Salben oder Puder. Eine parenterale Anwendung ist möglich mit Injektions- oder Infusionslösungen mit Ampullen, Flaschen oder Spritzampullen. Dem Fachmann der pharmazeutischen Technologie (Galenik) sind diese und andere Arzneimittel bekannt.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Polynukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 13 sowie die Polynukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 14. Die Polynukleotidsequenzen der SEQ ID Nr. 13 und 14 codieren für Mutationen des Glut1-Gens der Ratte, die im entsprechenden Protein zum Austausch einzelner Aminosäuren führen. Die Polynukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 13 codiert für ein Glut1-Protein, welches an Position 69 der Aminosäurekette einen Austausch von Valin durch Methionin enthält. Die Polynukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 14 codiert für ein Glut1-Protein, bei dem an Position 70 der Aminosäurekette ein Alanin durch Methionin ausgetauscht ist. Beide Proteinmutanten unterstützen die Aufnahme von Glukose bereits in einen Stamm, dessen Hexosetransporter durch Deletion ausgeschaltet sind, der aber noch nicht die Glukoseaufnahme durch das Wildtyp-Glut1-Protein unterstützt. Solche Mutanten können beispielsweise über Selektion auf Suppressormutationen oder über in vitro Mutagenese erhalten werden.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Glut1-Protein, welches durch die Polynukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 13 oder 14 codiert wird.

Die Erfindung betrifft auch Hefestämme, welche eine Polynukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 13 oder eine Polynukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 14 enthalten. Solche Hefestämme sind bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH als DSM 14026 und DSM 14027 hinterlegt. Für die Herstellung dieser Stämme werden Hefevektoren entsprechend der SEQ ID Nr. 13 oder 14 in einen Hefestamm transformiert, der sich auf Substraten mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann und dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit Hexose als einziger Kohlenstoffquelle eventuell wiederhergestellt wird, wenn in diesem Stamm ein Glut1 Gen zur Expression gebracht wird. Die Zellen werden dann nach der Transformation auf einem Medium ausgebracht, welches Glukose als einzige Kohlenstoffquelle enthält. Die sich auf diesem Medium

vermehrten Kolonien werden isoliert. Der so transformierte Hefestamm eignet sich beispielsweise zur Durchführung eines Verfahrens zur Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut1-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert.

5

## Abkürzungen

HXT Hexose Transporter

ORF Open Reading Frame

10 PCR Polymerase Chain Reaction

## Beispiele

### 15 Vermehrung der Hefestämme

Alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Hefestämme stammten vom Stamm CEN.PK2-1C (*MATa leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2*) ab. Die Herstellung eines Hefestammes mit Deletionen in den Hexose-Transportergenen

20 (*HXT*) wurde von Wieczorke et al., FEBS Lett. 464, 123 - 128 (1999) beschrieben:

EBY.18ga (*MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2*), EBY.VW4000 (*MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δmph2 Δmph3 Δstl1 leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2*). Die Medien beruhten auf 1%

Hefeextrakt und 2% Pepton (YP), während die Minimalmedien aus 0,67% Difco-

25 Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren (YNB) bestanden und Zusätze für Auxotrophiebedürfnisse sowie unterschiedliche Kohlenstoffquellen enthielten. Die Hefezellen wurden unter aerobischen Bedingungen bei 30°C auf einem Rundschüttler oder auf Agarplatten gezüchtet. Das Zellwachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) verfolgt.

30

## Bestimmung der Glukoseaufnahme

Der Glukosetransport wurde als Aufnahme von D-[U- $^{14}\text{C}$ ]-Glukose (Amersham) gemessen und die Kinetikparameter wurden aus Eadie-Hofstee-Graphiken bestimmt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, mit Phosphatpuffer gewaschen und wieder in Phosphatpuffer in einer Konzentration von 60 mg (Naßgewicht) pro ml suspendiert. Die Glukoseaufnahme wurde bei Glukosekonzentrationen zwischen 0,2 und 100 mM bestimmt, und die spezifische Aktivität des Substrats bewegte sich zwischen 0,1 und 55,5 kBq  $\mu\text{mol}^{-1}$ . Die Zellen und die Glukoselösungen wurden 5 Minuten bei 30°C vorinkubiert. Die Glukoseaufnahme wurde durch Versetzen der Zellen mit radioaktiver Glukose gestartet. Nachdem 5 Sekunden lang inkubiert worden war, versetzte man mit 10 ml eiskaltem Stoppuffer (0,1 M  $\text{K}_2\text{PO}_4$ , pH 6,5, 500 mM Glukose) und die Zellen wurden rasch auf Glasfaserfiltern ( $\varnothing=24$  mm, Whatman) abfiltriert. Die Filter wurden dreimal rasch mit eiskaltem Puffer gewaschen und die eingebaute Radioaktivität wurde mit einem Flüssigkeits-Szintillationszähler gemessen. Die Hemmung durch Cytochalasin B (Endkonzentration 20  $\mu\text{M}$ , gelöst in Ethanol) wurde in einem 15-Sekunden-Aufnahmetest mit 50 mM bzw. 100 mM radioaktiver Glukose gemessen, nachdem die Zellen 15 Minuten lang in Gegenwart des Hemmstoffs oder nur des Lösungsmittels inkubiert worden waren.

## Konstruktion von H2rg4g2 (SEQ ID Nr. 10) und H2rg1g2 (SEQ ID Nr. 12)

H2rg4g2 und H2rg1g2 sind DNA-Konstrukte, welche einen HXT2-Promotor (Promotor des Glukosetransportproteins 2 der Hefe) enthalten, der funktionell mit einem GLUT4- (in SEQ ID Nr. 10) oder GLUT1-Gen (in SEQ ID Nr. 12) aus der Ratte verbunden ist. Es wurde ein 0,5 kB langes *SalI/EcoRI*-*GAL2*-Promoterfragment der Plasmide GLUT1-pTV3 bzw. GLUT4-pTV3 (Kasahara und Kasahara, Biochem J. 315, 177 – 182 (1996); Kasahara und Kasahara, Biochim. Biophys. Acta 857, 146 – 154 (1997)) jeweils mit einem 0,5 kB langen DNA-Fragment, das den Hefe-*HXT2*-Promoter von –452 bp bis +9 bp (Genbank: P23585) enthielt, ersetzt.

Konstruktion von YEp4H7-HsGLUT1 (SEQ ID Nr. 11) und YEp4H7-HsGLUT4 (SEQ ID Nr. 9)

YEp4H7-HsGLUT1 und YEp4H7-HsGLUT4 sind Plasmide, in welchen ein

- 5 Promotorfragment der Positionen -392 bis -1 des HXT7-Promotors (Promotor des HXT7-Gens) funktionell mit einem GLUT1- (In SEQ ID Nr. 11) oder GLUT4-Gen (in SEQ ID Nr. 9) des Menschen verbunden ist. Das Fragment des Promotors wurde verwendet, da der komplette HXT7-Promotor durch Glukose reprimiert wird. Ein 0,4 kB langes *SacI/Spel*-MET25-Promoterfragment aus p426MET25 (Mumberg et al., Nucleic Acids Res. 22, 5767 – 5768 (1994)) wurde durch ein 0,4 kB langes DNA-Fragment enthaltend ein *HXT7*-Promoterfragment von den Positionen -392 bis -1, das mittels PCR mit den Primern P426H7-1 (SEQ ID Nr. 1) und P426H7-2 (SEQ ID Nr. 2) aus einem HXT7-Gen (Genbank:P39004) als Matrize amplifiziert worden war, ersetzt, wodurch man das Plasmid YEp4H7 (SEQ ID Nr. 15) erhielt. Die Human-GLUT1- und GLUT4-ORF (Open Reading Frame) wurden über 10 Zyklen mittels PCR mit den Primer-Paaren HSG1-F7/T2-HSG1 (SEQ ID Nr.3,4) für Glut1 und HSG4-F7/T2-HSG4 (SEQ ID Nr. 5,6) für Glut4 sowie einer humanen GLUT1 (EMBL:M20653) und humaner GLUT4-cDNA (Genbank:M20747) als Matrizen amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden nochmals über 10 Zyklen mit den Primern T71-ORF (SEQ ID Nr. 7) sowie T2-HSG1 (SEQ ID Nr. 4) bzw. T2-HSG4 (SEQ ID Nr. 6) amplifiziert. Stromaufwärts und stromabwärts der GLUT-ORF-Sequenzen enthalten die PCR-Endprodukte Sequenzen, die zur *HXT7*-Promoter- bzw. zur *CYC1*-Terminationsregion (iso-Cytochrome c1) des Plasmids YEp4H7 homolog sind. Sie wurden gemeinsam mit dem mit *EcoRI* linearisierten YEp4H7 in den Hefestamm EBY.F4-1 transformiert, wobei man nach homologer Rekombination in Hefe auf einem 2%igen Maltosemedium auf Uracilprototrophie selektierte.

Expression von Ratten-GLUT1 und -GLUT4 in einem hexosetransportdefizienten Hefestamm

30

Die Hefe-Multikopie-Expressionsplasmide GLUT1-pTV3e und GLUT4-pTV3e tragen die Ratten-Glukosetransportergene GLUT1 bzw. GLUT4 unter der Kontrolle des galaktoseinduzierbaren und glukosereprimierbaren Hefe-*GAL2*-Promoters. In beiden Konstrukten wurde der *GAL2*-Promoter durch den glukoseinduzierbaren Hefe-*HXT2*-

Promoter ersetzt. Diese Vektoren wurden in den Hefestamm EBY.18ga ( $\Delta hxt$ ) transformiert, der zur Aufnahme von keinerlei Hexosen fähig ist und daher auf Medien, die Glukose oder andere Hexosen als einzige Kohlenstoffquelle enthalten, nicht wachsen kann. Die Zellen wurden auf ein tryptophanfreies synthetisches

5 Medium mit Maltose als Kohlenstoffquelle ausplattiert. Die Transformanten wurden mit der Stempel-Methode auf das gleiche Basalmedium ohne Maltose, jedoch mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM) ausplattiert. Die Transformanten wuchsen auf den unterschiedlichen Glukosemedien nicht, nicht einmal bei bis zu einwöchiger Inkubation bei 30°C. Dies belegt, daß der

10 Glut1-und Glut4-Glukosetransporter in einem normalen Stamm von *S. cerevisiae* die Aufnahme von Glukose nicht unterstützen.

#### Aufnahme von Glukose über den Glut1-Transporter in Hefezellen

15 Es zeigte sich, daß nach längerer Inkubation von Glut1-Transformanten des Stamms EBY.18ga auf einem Glukosemedium sich Kolonien (im folgenden Supressormutanten oder Supressorkolonien) vermehren konnten, die offenbar fähig wurden, Glukose aufzunehmen und zu verwerten. Deshalb plattierte man die GLUT1- und GLUT4-Transformanten auf Agarplatten aus, die ein YNB-Medium mit

20 10 mM Glukose als einziger Kohlenstoffquelle enthielten. Nach Bestrahlung mit UV-Licht in einer subletalen Dosis wurden die Zellen 7-14 Tage bei 30°C inkubiert. Während bei den GLUT4-Transformanten keine Supressorkolonien erschienen, wuchsen auf den Agarplatten mit den GLUT1-Transformanten mehrere Supressorkolonien, die zum Wachstum auf Glukose *fähig* waren. Mehrere der

25 GLUT1-Supressormutanten wurden mehr als 15 Generationen lang in nichtselektivem YP-Maltose-Medium gezüchtet. Alle Zellen, die ihre Plasmide verloren hatten, waren nicht länger fähig, auf Medien, die Glukose als Kohlenstoffquelle enthielten, zu wachsen. Damit konnte gezeigt werden, daß Wachstum auf Glukose als einziger Kohlenstoffquelle von GLUT1 abhängig war.

30 Nach der Neutransformierung des ursprünglichen Wildtyp-H2rg1g2-Plasmids in diese Zellen erlangte einer von mehreren Hefestämmen wiederum die Fähigkeit, auf Glukose zu wachsen. Das belegt, daß dieser Stamm eine Mutation in seinem Genom enthält, die die Hemmwirkung auf funktionelle GLUT1-Expression eliminiert.

Das mutierte Allel wurde mit *fgy1-1* bezeichnet (was für "functional expression of GLUT1 in yeast" steht), und der Stamm wurde mit der Bezeichnung EBY.S7 versehen.

- 5 Aus anderen Suppressormutanten wurden H2rg1g2-Plasmide isoliert, in *E. coli* amplifiziert und in den ursprünglichen glukosetransportdefizienten Hefestamm EBY.18ga ( $\Delta hxt$ ) zurücktransformiert. Mehrere dieser Plasmide konnten ein Wachstum auf einem synthetischen Medium mit 10 mM Glukose als einziger Kohlenstoffquelle ermöglichen. Diese GLUT1-Sequenzen enthielten demnach
- 10 Mutationen, die das entsprechende GLUT1-Protein in der Hefe zu einem funktionellen Glukosetransporter umwandelten. Solche Mutanten enthielten beispielsweise einen Austausch von Valin nach Methionin an der Position der Aminosäure 69 (SEQ ID Nr.13) oder einen Austausch von Alanin nach Methionin an der Position der Aminosäure 70 (SEQ ID Nr. 14). Die Mutante gemäß SEQ ID Nr. 13
- 15 wurde im Mutantenscreening wie vorstehend beschrieben gefunden. Die Mutante gemäß SEQ ID Nr. 14 erhielt man durch in vitro Mutagenese wie im folgenden dargestellt. Das Prinzip der angewandten in vitro Mutagenese-Methode ist in Boles und Miosga (1995) beschrieben (Boles und Miosga, Curr Genet. 28, 197 – 198 (1995)). In einer ersten PCR-Reaktion wurde das Plasmid YEpH2-rGLUT1 (20 ng)
- 20 als DNA-Vorlage zusammen mit den Primern seqhxt2 (SEQ ID Nr. 16) und glutmet2 (SEQ ID Nr. 17) (jeweils 100 pmol) eingesetzt (PCR-Bedingungen: 95°C 45 sec, 50°C 30 sec, 72°C 2 min, 25 Zyklen, Taq-Polymerase). Der Primer glutmet2 enthält eine gegenüber dem normalen GLUT1-Gen geänderte Basensequenz, die zu einem Austausch von Alanin nach Methionin an der Position der Aminosäure 70 von
- 25 GLUT1 der Ratte führt. Das resultierende PCR-Fragment wurde mittels Agarosegelelektrophorese und anschließender Gelextraktion gereinigt. In einer zweiten PCR-Reaktion wurde das gereinigte PCR-Fragment (20 ng) zusammen mit dem Plasmid GLUT1-pTV3 (Kasahara und Kasahara, Biochem J. 315, 177 – 182 (1996)) als DNA-Vorlage (50 ng) und zusammen mit den Primern seqhxt2 und
- 30 seq2gal2 (SEQ ID Nr. 18) (jeweils 100 pmol) eingesetzt (PCR-Bedingungen: 95°C 45 sec, 54°C 30 sec, 72°C 2 min, 20 Zyklen, Taq-Polymerase). Da der Primer seqhxt2 nur an das Fragment der ersten PCR-Reaktion bindet, wurden in dieser zweiten PCR-Reaktion nur solche DNA-Sequenzen amplifiziert, die zu einem



Austausch von Alanin nach Methionin an der Position der Aminosäure 70 führen.

Das resultierende PCR-Fragment mit dem mutierten GLUT1-Gen wurde mittels Agarosegelelektrophorese und anschließender Gelextraktion gereinigt und gegen das Wildtyp GLUT1-Gen im Plasmid YEpH2-rGLUT1 ausgetauscht. Dieses Plasmid (SEQ ID Nr. 14) wurde in den glukosetransportdefizienten Hefestamm EBY.18ga ( $\Delta hxt$ ) transformiert und ermöglichte ein Wachstum auf einem synthetischen Medium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle.

Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, die Glukose über den Glut4-Transporter aufnehmen

Der Stamm EBY.S7 ( $\Delta hxt fgy1-1$ ) enthält offenbar eine Genommutation, nämlich *fgy1-1*, die Glut1 befähigt, in der Hefe funktionell zu werden und die Aufnahme von Glukose durch die Plasmamembran hindurch in die Zellen zu unterstützen.

Nach Transformation des Stamms EBY.S7 ( $\Delta hxt fgy1-1$ ) durch H2rg4g2 konnten Supressor-Kolonien isoliert werden, die zur Vermehrung auf Medien mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle befähigt waren.

Neun dieser GLUT4-Suppressormutanten wurden über mehr als 15 Generationen lang in nichtselektivem YP-Maltose-Medium gezüchtet. Alle Zellen, die ihre Plasmide verloren hatten, waren ebenfalls nicht mehr fähig, auf 10 mM Glukosemedien zu wachsen, was beweist, daß das frühere Wachstum GLUT4-abhängig war. Die H2rg4g2-Plasmide wurden aus den neun Suppressorstämmen wieder isoliert, in *E. coli* amplifiziert und in den ursprünglichen glukosetransportdefizienten Hefestamm EBY.S7 zurücktransformiert. Keines der Plasmide konnte auf einem synthetischen Medium mit 10 mM Glukose als einzige Kohlenstoffquelle ein Wachstum ermöglichen. Damit wurde gezeigt, daß sie keine "aktivierte" Mutantenformen von GLUT4 enthielten. Nach der erneuten Transformation des ursprünglichen Wildtyp-H2rg4g2 -Plasmids in die neun nunmehr plasmidfreien Suppressorstämmen erlangten diese alle wiederum die Fähigkeit zurück, auf Glukose wachsen zu können, und zwar im Unterschied zu Transformanten, die einen Kontrollvektor ohne Glut4-Transportproteingen enthielten. Die entsprechenden Mutationen dieses Stammes

wurden *fgy4-X* ( $x = 1 - 9$ ) genannt. Die mutierten Allele *fgy4-X* bewirken die funktionelle GLUT4-Expression eines in diesen Stämmen exprimierten GLUT4-Gens. Damit konnte die Aufgabe der Erfindung gelöst werden. Die Tabelle enthält eine Übersicht der verwendeten Hefestämme dieser Erfindung.

5

Die Tabelle gibt eine Übersicht der in dieser Erfindung verwendeten Hefestämme einschließlich des Genotyp, den für die Vermehrung einzuhaltenden Wachstumsbedingungen und der jeweiligen Hinterlegungsnummer bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

10



15

20



25

30

## Patentansprüche

1. Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher sich auf Substraten mit  
 5 Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann, wobei dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren wiederhergestellt wird, wenn in diesem Stamm ein GLUT4-Gen zur Expression gebracht wird.
- 10 2. Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nach Anspruch 1 wie hinterlegt bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH als DSM 14035, DSM 14036 oder DSM 14037.
- 15 3. Herstellung eines Stammes der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nach Anspruch 1 oder 2, erhältlich durch
  - a) Bereitstellung einer Hefe,
  - b) Beseitigung der Funktion aller Hexosetransporter dieser Hefe aus a) durch Mutation oder Deletion der entsprechenden genomischen Sequenzen.
- 20 4. Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, wobei dieser Stamm ein GLUT4-Gen enthält.
- 25 5. Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nach Anspruch 4, wobei ein rekombinantes GLUT4-Gen unter funktioneller Kontrolle eines in Hefe exprimierbaren Promotors steht.
6. Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nach Anspruch 4 oder 5, wobei das Glut4-Gen aus Mensch, Maus oder Ratte stammt.
- 30 7. Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nach einem oder mehreren der Ansprüche 4 bis 6 wie hinterlegt bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH als DSM 14038, DSM 14039 oder DSM 14040.

8. Herstellung eines Stammes der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nach einem oder mehreren der Ansprüche 4 bis 7, erhältlich durch

a) Bereitstellung einer Hefe gemäß Anspruch 1 bis 3;

b) Transformation der Hefe aus a) durch ein Plasmid, welches ein GLUT-4 Gen

5 enthält, welches unter funktioneller Kontrolle eines in Hefe exprimierbaren Promotors steht;

c) Ausbringen eines Stammes nach Transformation gemäß b) auf einem Medium, welches Glukose als einzige Kohlenstoffquelle enthält;

10 d) Isolierung eines Stammes nach Ausbringen gemäß c), welcher sich auf einem solchen Medium vermehrt.

9. Herstellung nach Anspruch 8, wobei zur Transformation ein GLUT4-Gen aus Mensch, Maus oder Ratte verwendet wird.

15 10. Herstellung nach Anspruch 8 oder 9, wobei zur Transformation ein Vektor, der eine Polynukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 9 oder 10 enthält, verwendet wird.

11. Verfahren verwendbar zur Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut4-Proteins transportiert wird, vermehrt oder  
20 vermindert enthaltend folgende Verfahrensschritte:

a) Bereitstellung eines Stammes der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 4 bis 10;

b) Bestimmung der Menge einer Hexose, die von diesem Stamm, der gemäß a) bereitgestellt wird, aufgenommen wird;

25 c) Bereitstellung einer Verbindung;

d) In-Kontakt-Bringen eines Stammes der Hefe bereitgestellt gemäß a) mit einer Verbindung bereitgestellt gemäß c)

e) Bestimmung der Menge einer Hexose, die in den Stamm der Hefe nach In-Kontakt-Bringen gemäß d) aufgenommen wird;

30 f) Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut4-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert, durch Vergleich der in den Stamm aufgenommenen Menge der Hexose vor und nach In-Kontakt-Bringen gemäß d), die gemäß b) und e) bestimmt wird.

12. Arzneimittel enthaltend eine Verbindung, welche durch ein Verfahren gemäß Anspruch 11 identifiziert und gegebenenfalls weiterentwickelt wurde, sowie Hilfsstoffe zur Formulierung des Arzneimittels für die Behandlung von Diabetes oder Übergewichtigkeit.

5

13. Verwendung einer Verbindung, welche durch ein Verfahren gemäß Anspruch 11 identifiziert und gegebenenfalls weiterentwickelt wurde, zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Diabetes oder Übergewichtigkeit.

10 14. Verfahren verwendbar zur Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut1-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert enthaltend folgende Verfahrensschritte:

a) Bereitstellung eines Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher sich auf Substraten mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren  
15 kann, und dessen Fähigkeit sich auf einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren wiederhergestellt wird, wenn er ein Glut1-Gen zur Expression bringt, wobei dieser Stamm ein GLUT-1 Gen enthält, welches unter funktioneller Kontrolle eines in Hefe exprimierbaren Promotors steht.

b) Bestimmung der Menge einer Hexose, die von diesem Stamm bereitgestellt  
20 gemäß a) aufgenommen wird;

c) Bereitstellung einer Verbindung;

d) In-Kontakt-Bringen eines Stammes der Hefe gemäß a) mit einer Verbindung  
gemäß c)

e) Bestimmung der Menge einer Hexose, die in den Stamm der Hefe nach In-  
25 Kontakt-Bringen gemäß d) aufgenommen wird;

f) Identifizierung einer Verbindung, welche die Menge einer Hexose, die mittels eines Glut1-Proteins transportiert wird, vermehrt oder vermindert, durch Vergleich der in den Stamm aufgenommenen Menge der Hexose vor und nach In-Kontakt-Bringen gemäß d), die gemäß b) und e) bestimmt wird.

30

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei gemäß a) ein Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mit der Stammnummer DSM 14026, DSM 14027 oder DSM14033 bereitgestellt wird.

16. Arzneimittel enthaltend eine Verbindung, welche durch ein Verfahren gemäß Anspruch 14 oder 15 identifiziert und gegebenenfalls weiterentwickelt wurde, sowie Hilfsstoffe zur Formulierung des Arzneimittels für die Behandlung von Diabetes oder Übergewichtigkeit.

5

17. Verwendung einer Verbindung, welche durch ein Verfahren gemäß Anspruch 14 oder 15 identifiziert und gegebenenfalls weiterentwickelt wurde, zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Diabetes oder Übergewichtigkeit.

10 18. Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wie hinterlegt bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH unter dem Aktenzeichen DSM 14026 oder DSM 14027.

15 19. Herstellung eines Stammes von *Saccharomyces cerevisiae* nach Anspruch 18, erhältlich durch

- a) Bereitstellung einer Hefe gemäß Anspruch 1 bis 3;
- b) Transformation der Hefe aus a) durch ein Plasmid enthaltend eine Polynukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 13 oder 14;
- c) Ausbringen eines Stammes nach Transformation gemäß b) auf einem Medium,
- 20 welches Glukose als einzige Kohlenstoffquelle enthält;
- d) Isolierung eines Stammes nach Ausbringen gemäß c), welcher sich auf einem solchen Medium vermehrt.

25 20. Polynukleotidsequenz codierend für ein GLUT1-Protein enthaltend einen Austausch von Valin nach Methionin an Position 69 der Aminosäuresequenz.

21. Polynukleotidsequenz nach Anspruch 20 enthaltend eine Sequenz der SEQ ID Nr. 13.

30 22. Glut1-Protein codiert durch eine Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 20 oder 21.

23. Polynukleotidsequenz codierend für ein GLUT1-Protein enthaltend einen Austausch von Alanin nach Methionin an Position 70 der Aminosäuresequenz.

24. Polynukleotidsequenz nach Anspruch 23 enthaltend eine Sequenz der SEQ ID Nr. 14.

- 5 25. Glut1-Protein codiert durch eine Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 23 oder 24.

10



15

20



25

30

### Zusammenfassung:

Die Erfindung betrifft einen Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher  
5 durch Deletion der genomischen Sequenzen keine Hexosetransporter mehr  
ausbildet und in Folge dessen sich auf Substraten mit Hexosen als einziger  
Kohlenstoffquelle nicht mehr vermehren kann, wobei dessen Fähigkeit sich auf  
einem Substrat mit einer Hexose als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren  
wiederhergestellt wird, wenn er ein GLUT4-Gen zur Expression bringt.

10





Stammliste

Nr.	Stamm	Genotyp	Phänotyp	Plasmid	DSM-Nr.
1	EBY.18ga	MATa $\Delta$ hxt1-17 $\Delta$ gal2 $\Delta$ agt1 $\Delta$ stl1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3- $\Delta$ 1 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2	wächst mit 1% Maltose als C-Quelle; auxotroph für Glucose, Leucin, Tryptophan, Histidin und Uracil	-----	DSM 14031
2	EBY.18ga	MATa $\Delta$ hxt1-17 $\Delta$ gal2 $\Delta$ agt1 $\Delta$ stl1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3- $\Delta$ 1 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2	wächst mit 0,2% Glucose oder 1% Maltose als C-Quelle; auxotroph für Leucin, Histidin und Uracil	YEpH2-rGLUT1V69M (Selektionsmarker TRP1)	DSM 14026
3	EBY.18ga	MATa $\Delta$ hxt1-17 $\Delta$ gal2 $\Delta$ agt1 $\Delta$ stl1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3- $\Delta$ 1 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2	wächst mit 0,2% Glucose oder 1% Maltose als C-Quelle; auxotroph für Leucin, Histidin und Uracil	YEpH2-rGLUT1A70M (Selektionsmarker TRP1)	DSM 14027
4	EBY.S7	MATa $\Delta$ hxt1-17 $\Delta$ gal2 $\Delta$ agt1 $\Delta$ stl1 fgy1-1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-28,9 his3- $\Delta$ 1 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2	wächst mit 1% Maltose als C-Quelle; auxotroph für Glucose, Leucin, Tryptophan, Histidin und Uracil	-----	DSM 14032
5	EBY.S7	MATa $\Delta$ hxt1-17 $\Delta$ gal2 $\Delta$ agt1 $\Delta$ stl1 fgy1-1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-28,9 his3- $\Delta$ 1 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2	wächst mit 0,2% Glucose oder 1% Maltose als C-Quelle; auxotroph für Leucin, Tryptophan und Histidin	YEp4H7-HsGLUT1 (Selektionsmarker URA3)	DSM 14033
6	EBY.VW4000	MATa $\Delta$ hxt1-17 $\Delta$ gal2 $\Delta$ agt1 $\Delta$ stl1 $\Delta$ mph2 $\Delta$ mph3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3- $\Delta$ 1 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2	wächst mit 1% Maltose als C-Quelle; auxotroph für Glucose, Leucin, Tryptophan, Histidin und Uracil	-----	DSM 14034
7	EBY.f4-1	MATa $\Delta$ hxt1-17 $\Delta$ gal2 $\Delta$ agt1 $\Delta$ stl1 fgy4-1 fgy4-1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3- $\Delta$ 1 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2	wächst mit 1% Maltose als C-Quelle; auxotroph für Glucose, Leucin, Tryptophan, Histidin und Uracil	-----	DSM 14035
8	EBY.f4-4	MATa $\Delta$ hxt1-17 $\Delta$ gal2 $\Delta$ agt1 $\Delta$ stl1 fgy4-4 fgy4-1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3- $\Delta$ 1 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2	wächst mit 1% Maltose als C-Quelle; auxotroph für Glucose, Leucin, Tryptophan, Histidin und Uracil	-----	DSM 14036
9	EBY.f4-7	MATa $\Delta$ hxt1-17 $\Delta$ gal2 $\Delta$ agt1 $\Delta$ stl1 fgy4-7 fgy4-1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3- $\Delta$ 1 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2	wächst mit 1% Maltose als C-Quelle; auxotroph für Glucose, Leucin, Tryptophan, Histidin und Uracil	-----	DSM 14037
10	EBY.f4-1	MATa $\Delta$ hxt1-17 $\Delta$ gal2 $\Delta$ agt1 $\Delta$ stl1 fgy4-1 fgy4-1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3- $\Delta$ 1 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2	wächst mit 0,2% Glucose oder 1% Maltose als C-Quelle; auxotroph für Leucin, Tryptophan und Histidin	YEp4H7-HsGLUT4 (Selektionsmarker URA3)	DSM 14038
11	EBY.f4-4	MATa $\Delta$ hxt1-17 $\Delta$ gal2 $\Delta$ agt1 $\Delta$ stl1 fgy4-4 fgy4-1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3- $\Delta$ 1 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2	wächst mit 0,2% Glucose oder 1% Maltose als C-Quelle; auxotroph für Leucin, Tryptophan und Histidin	YEp4H7-HsGLUT4 (Selektionsmarker URA3)	DSM 14039
12	EBY.f4-7	MATa $\Delta$ hxt1-17 $\Delta$ gal2 $\Delta$ agt1 $\Delta$ stl1 fgy4-7 fgy4-1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3- $\Delta$ 1 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2	wächst mit 0,2% Glucose oder 1% Maltose als C-Quelle; auxotroph für Leucin, Tryptophan und Histidin	YEp4H7-HsGLUT4 (Selektionsmarker URA3)	DSM 14040

Basismedium: 0,67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco); pH 6,2. Supplementierung der Auxotrophien: Leucin (0,44 mM), Tryptophan (0,19 mM), Histidin (0,25 mM), Uracil (0,44 mM). Maltose kann zwischen 1-2% eingesetzt werden; Glucose zwischen 0,2-2% (besseres Wachstum bei niedrigeren Konzentrationen).

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Aventis Pharma Deutschland GmbH

<120> Hefestamm von *Saccharomyces cerevisiae* mit  
funktioneller Expression eines Glut4-Proteins

<130> AVE D-2001/A002

<140>

<141>

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ctagagctcg taggaacaat ttcgg

25

<210> 2

<211> 60

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

cgactagtgt gatggtgatg gtgatgcatg ttaacttttt gattaaaatt aaaaaaactt 60

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

ttaatttttaa tcaaaaaatg gagcccagca gcaag

35

<210> 4

<211> 52

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

acatgactcg aggtcgacgg tatcgataag cttatcacac ttgggaatca gc

52

<210> 5

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ttaatttttaa tcaaaaaatg ccgtcgggct tccaa

35

<210> 6

<211> 52

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

acatgactcg aggtcgacgg tatcgataag cttatcagtc gttctcatct gg

52

<210> 7

<211> 73

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 7

caaagaataa acacaaaaac aaaaagtttt ttttaatttta atcaaaaaat gtctgaattc 60  
agcagcaaga agg

73

<210> 8

<211> 71

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 8

aagtttcttt gtctccgtcc cactcaactt tctgagaaca aatgatcgac aaataatagg 60  
tttaggtaag g

71

<210> 9

<211> 7828

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

atgccgctcgg gcttccaaca gataggctcc gaagatgggg aacccccctca gcagcgagtg 60  
actgggaccc tggctccttg tgtgttctct gcgggtgcttg gctccctgca gtttgggtac 120  
aacattgggg tcatcaatgc cctcagaag gtgattgaac agagctacaa tgagacgttg 180  
ctggggaggc aggggcctga gggaccagc tccatccctc caggcaccct caccaccctc 240  
tgggcccctct cegtggccat cttttccgtg ggcggtatga tttcctcctt cctcattggt 300  
atcatctctc agtggcttg aaggaaaagg gccatgctgg tcaacaatgt cctggcggtg 360  
ctggggggca gcctcatggg cctggccaac gctgctgcct cctatgaaat gctcatcctt 420  
ggacgattcc tcattggcgc ctactcaggg ctgacatcag ggctgggtgcc catgtacgtg 480  
ggggagattg cteccactca cctgcggggc gccctgggga cgctcaacca actggccatt 540  
gttatcggca ttctgatgc ccagggtgctg ggcttggagt cctcctggg cactgccagc 600  
ctgtggccac tgctcctggg cctcacagt ctacctgcc tctgcagct ggtcctgctg 660  
cccttctgtc ccgagagccc ccgctacct tacatcatcc agaattctga ggggcctgcc 720  
agaaagagtc tgaagcgct gacaggctgg gccgatgttt ctggagtgt ggctgagctg 780  
aaggatgaga agcgggaagc ggagcgtgag cgccactgt cctgctcca gctcctgggc 840  
agccgtaccc accggcagcc cctgatcatt gcggtcgtgc tgcagctgag ccagcagctc 900  
tctggcatca atgctgtttt ctattattcg accagcatct tcgagacagc aggggtaggc 960  
cagcctgcct atgccaccat aggagctggt gtggtcaaca cagtcttcac cttggtctcg 1020  
gtgttgttg tggagcgggc ggggcgcgg acgctccatc tctgggcct ggcgggcatg 1080  
tgtggctgt ccactctgat gactgtggct ctgctcctgc tggagcgagt tccagccatg 1140  
agctacgtct ccattgtggc catctttggc ttcgtggcat tttttgagat tggccctggc 1200  
cccattcctt ggttcacgt ggccgagctc ttcagccagg gaccccgccc ggcagccatg 1260  
gctgtggctg gtttctccaa ctggacgagc aacttcatca ttggcatggg tttccagtat 1320  
gttgcgagg ctatggggc ctacgtcttc cttctatttg cggctcctc gctgggcttc 1380  
ttcatcttca cttcttaag agtacctgaa actcgaggcc ggacgtttga ccagatctca 1440  
gctgccttcc accggacacc ctctctttta gagcaggagg tgaaacccag cacagaactt 1500  
gagtatttag ggccagatga gaacgactga taagcttatc gataccgtcg acctcgagtc 1560  
atgtaattag ttatgtcacg cttacattca cgcctcccc ccacatccgc tctaaccgaa 1620  
aaggaaggag ttagacaacc tgaagtctag gtccctatth atttttttat agttatgtta 1680  
gtattaagaa cgttatttat atttcaaatt tttctttttt ttctgtacag acgctgttac 1740  
gcatgtaaca ttatactgaa aaccttgctt gagaagggtt tgggacgctc gaaggcttta 1800  
atthtgcggc ggtacccaat tcgcccata gtgagtcgta ttacgcgcgc tctactggccg 1860  
tcgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcgttac ccaacttaat cgccttgagc 1920  
cacatcccc tttcgccagc tggcgtaata gcgaaggagc ccgcaccgat cgccttccc 1980  
aacagttgag cagcctgaat gggaatggc gcgacgcgc ctgtagcggc gcattaagcg 2040  
cggcggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgtacact tgccagcgcc ctagcgccc 2100  
ctcctttcgc tttcttccct tctttctcg ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc 2160  
taaactgggg gctcccttta ggttccgat ttagtgcttt acggcacctc gacccccaaa 2220  
aacttgatta ggtgatggt tcacgtagt ggccatcgcc ctgatagacg gtttttccg 2280  
ctttgacgtt ggagtcacg ttctttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac 2340  
tcaacctat ctcggtctat tcttttgatt tataagggat tttgccgatt tcggcctatt 2400  
ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgt 2460  
ttacaatttc ctgatgcgt attttctcct tacgcactcg tgcggtattt cacaccgat 2520  
agggtaataa ctgatataat taaattgaag ctctaatttg tgagtttagt atacatgat 2580  
ttacttataa tacagttttt tagttttgct ggccgcatct tctcaaatat gcttcccagc 2640  
ctgcttttct gtaacgttca cctctacct tagcatccct tccctttgca aatagctctc 2700  
ttccaacaat aataatgtca gatcctgtag agaccacatc atccacggtt ctatactgtt 2760  
gacccaatgc gtctcccttg tcatctaaac ccacaccggg tgtcataatc aaccaatcgt 2820  
aaccttcac tcttccacc atgtctcttt gagcaataaa gccgataaca aaatctttgt 2880

cgctcttcgc	aatgtcaaca	gtacccttag	tatattctcc	agtagatagg	gagcccttgc	2940
atgacaattc	tgctaacatc	aaaaggcctc	taggttcctt	tggtacttct	tctgccgcct	3000
gcttcaaacc	gctaacaata	cctgggcccc	ccacaccgtg	tgcatctcgt	atgtctgccc	3060
attctgctat	tctgtatata	ccgcagagt	actgcaattt	gactgtatta	ccaatgtcag	3120
caaattttct	gtcttcgaag	agtaaaaaat	tgtacttggc	ggataatgcc	tttagcggct	3180
taactgtgcc	ctccatggaa	aaatcagtc	agatatccac	atgtgttttt	agtaaaacaa	3240
ttttgggacc	taatgcttca	actaactcca	gtaattcctt	ggtggtacga	acatccaatg	3300
aagcacacaa	gtttgtttgc	ttttcgtgca	tgatattaaa	tagcttggca	gcaacaggac	3360
taggatgagt	agcagcacgt	tccttatatg	tagctttcga	catgatttat	cttcgtttcc	3420
tgagggtttt	tgctctgtgc	agttgggtta	agaatactgg	gcaatttcat	gtttcttcaa	3480
cactacatat	gcgtatatat	accaatctaa	gtctgtgctc	cttccttcgt	tcttccttct	3540
gttcggagat	taccgaatca	aaaaaatttc	aaagaaaccg	aaatcaaaaa	aaagaataaa	3600
aaaaaaatga	tgaattgaat	tgaaaagctg	tggtatggtg	cactctcagt	acaatctgct	3660
ctgatgccgc	atagttaagc	cagccccgac	acccgccaac	acccgctgac	gcgccctgac	3720
gggcttgtct	gctcccggca	tcgcgttaca	gacaagctgt	gaccgtctcc	gggagctgca	3780
tgtgtcagag	gttttcaccg	tcataccga	aacgcgcgag	acgaaagggc	ctcgtgatac	3840
gcctattttt	ataggttaat	gtcatgataa	taatggtttc	ttagtatgat	ccaatatcaa	3900
aggaaatgat	agcattgaag	gatgagacta	atccaattga	ggagtggcag	catatagaac	3960
agctaaaggg	tagtgctgaa	ggaagcatat	gataccccgc	atggaatggg	ataatatcac	4020
aggaggtact	agactacctt	tcatactaca	taaatagacg	catataagta	cgcattttaag	4080
cataaacacg	cactatgccg	ttcttctcat	gtatatatat	atacaggcaa	cacgcagata	4140
taggtgcgac	gtgaacagtg	agctgtatgt	gcgcagctcg	cgttgcattt	tcggaagcgc	4200
tcgttttcgg	aaacgctttg	aagttcctat	tccgaagttc	ctattctcta	gaaagtatag	4260
gaacttcaga	gcgcttttga	aaacccaaaag	cgctctgaag	acgcactttc	aaaaaaccaa	4320
aaacgcaccg	gactgtaacg	agctactaaa	atattgcgaa	taccgcttcc	acaaacattg	4380
ctcaaaagta	tctctttgct	atatatctct	gtgctatata	cctatataac	ctacccatcc	4440
acctttcgct	ccttgaactt	gcatactaac	tcgacctcta	cattttttat	gtttatctct	4500
agtattactc	tttagacaaa	aaaattgtag	taagaactat	tcataagagt	aatcgaaaaac	4560
aatacgaaaa	tgtaaacatt	tcctatacgt	agtatataga	gacaaaatag	aagaaaccgt	4620
tcataatttt	ctgaccaatg	aagaatcatc	aacgctatca	ctttctgttc	acaaagtatg	4680
cgcaatccac	atcggtatag	aatataatcg	gggatgcctt	tatcttgaaa	aaatgcaccc	4740
gcagcttcgc	tagtaatcag	taaacgcggg	aagtggagtc	aggctttttt	tatggaagag	4800
aaaatagaca	ccaaagtagc	cttcttctaa	ccttaacgga	cctacagtgc	aaaaagttat	4860
caagagactg	cattatagag	cgcacaaaag	agaaaaaaaag	taatctaaga	tgctttgtta	4920
gaaaaaatagc	gctctcgga	tgcatTTTTT	tagaacaata	aagaagtata	gattctttgt	4980
tggtaaaata	gcgctctcgc	gttgcatTTT	tgctctgtaa	aaatgcagct	cagattcttt	5040
gtttgaaaaa	ttagcgctct	cgcggtgcat	ttttgtttta	caaaaatgaa	gcacagattc	5100
ttcgttggta	aaatagcgct	ttcgcggtgc	atttctgttc	tgtaaaaatg	cagctcagat	5160
tctttgtttg	aaaaatttagc	gctctcgcgt	tgcatTTTTT	ttctacaaaa	tgaagcacag	5220
atgcttcggt	caggtggcac	ttttcgggga	aatgtgcgcg	gaacccttat	ttgtttatTT	5280
ttctaaatac	attcaaatat	gtatccgctc	atgagacaat	aaccctgata	aatgcttcaa	5340
taatattgaa	aaaggaagag	tatgagtatt	caacatttcc	gtgtcgccct	tattcccttt	5400
tttgcggeat	tttgcccttc	tgTTTTTgct	caccagaaa	cgctggtgaa	agtaaaagat	5460
gctgaagatc	agttgggtgc	acgagtgggt	tacatcgaa	tggtatctca	cagcggtaag	5520
atccttgaga	gttttcgccc	cgaagaacgt	tttccaatga	tgagcacttt	taaagtTctg	5580
ctatgtggcg	cggtattatc	ccgtattgac	gccgggcaag	agcaactcgg	tcgccgcata	5640
cactattctc	agaatgactt	ggttgagtac	tcaccagtca	cagaaaagca	tcttacggat	5700
ggcatgacag	taagagaatt	atgcagtgc	gccataacca	tgagtataaa	cactgcccgc	5760

aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg 5820  
ggggatcatg taactcgctt tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac 5880  
gacgagcgtg acaccacgat gctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact 5940  
ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggccgataaa 6000  
gttgcaggac cacttctgct ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct 6060  
ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggtaagccc 6120  
tcccgtatcg tagttatcta caccgacggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga 6180  
cagatcgctg agataggtgc ctcactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac 6240  
tcatatatac ttttagattga tttaaaactt cttttttaat ttaaaaggat ctaggtgaag 6300  
atcctttttg ataatctcat gacaaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt ccactgagcg 6360  
tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc 6420  
tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag 6480  
ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc 6540  
cttctagtgt agccgtagt ttggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac 6600  
ctcgctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc 6660  
gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt 6720  
tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt 6780  
gagctatgag aaagcggcac gcttcccga gggagaaagg cggacaggta tccggtgaagc 6840  
ggcagggctg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt 6900  
tatagtctg tcgggttttc ccacctctga cttgagcgtc gattttttgtg atgctcgtca 6960  
ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt 7020  
tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt 7080  
attaccgcct ttgagttagc tgataccgct cgcgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag 7140  
tcagttagcg aggaagcga agagcgcca atacgcaaac cgctctccc gcgcgcttgg 7200  
ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg tttcccgaact ggaaagcggg cagttagcgc 7260  
aacgcaatta atgtgagtta cctcactcat taggcacccc aggctttaca ctttatgctt 7320  
ccggctccta tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg aaacagctat 7380  
gaccatgatt acgccaagcg cgcaattaac cctcactaaa gggaacaaaa gctggagctc 7440  
gtaggaacaa tttcgggccc ctgcgtgttc ttctgagggt catcttttac atttgcttct 7500  
gctggataat tttcagaggc aacaaggaaa aattagatgg caaaaagtcg tctttcaagg 7560  
aaaaatcccc accatcttcc gagatccctt gtaacttatt ggcaactgaa agaataaaaa 7620  
ggaggaaaaat acaaaatata ctagaactga aaaaaaaaaa gtataaatag agacgatata 7680  
tgccaatact tcacaatgtt cgaatctatt cttcatttgc agctattgta aaataataaa 7740  
acatcaagaa caaacaagct caacttgtct tttctaagaa caaagaataa acacaaaaaac 7800  
aaaaagtttt ttttaatttta atcaaaaa 7828

<210> 10

<211> 2386

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 10

tcgactctag aggatccctt taagctaate cttatgaate cggagaaaag cggggtcttt 60  
taactcaata aaattttccg aaatcctttt tcctacgcgt tttcttcggg aactagatag 120  
gtggctcttc cactgttttt tccatcattt tagtttttcg caagccatgc gtgccttttc 180  
gtttttgoga tggcgaacga gggctggaaa aattaacggg acgccgcta acgatagtaa 240  
taggccacgc aactggcgtg gacgacaaca ataagtcgcc ctttttttat gttttcaaaa 300

cctagcaacc	cccaccaaac	ttgtcatcgt	tcccggattc	acaaatgata	taaaaagcga	360
ttacaattct	acattctaac	cagatttgag	atttcctctt	tctcaattcc	tcttatatta	420
gattataaga	acaacaaatt	aaattacaaa	aagacttata	aagcaacata	atgtctgaat	480
tccagcagat	cggctctgaa	gatggggaac	ccccctagca	gcgagtgact	gggacactgg	540
tccttgctgt	attctcagct	gtgcttggct	cccttcagtt	tggctataac	attggagtca	600
tcaacgcccc	acagaaagtg	attgaacaga	gctacaatgc	aacttggctg	ggtaggcagg	660
gtcctggggg	accggactcc	atcccacaag	gcaccctcac	taccctttgg	gctctctccg	720
tggccatctt	ctctgtgggt	ggcatgattt	cctcctttct	cattggcatc	atttctcaat	780
ggttgggaag	gaaaagggct	atgctggcca	acaatgtctt	ggctgtgctg	gggggcgccc	840
tcatgggcct	agccaatgcc	gcggcctcct	atgagatact	cattctcgga	cggttcctca	900
ttggcgccta	ctcagggcta	acatcagggt	tggcgcctat	gtatgtggga	gaaatcgccc	960
ccactcatct	tgggggtgcc	ttgggaacac	tcaaccaatt	ggccatcgtc	attggcattc	1020
tggttgcccc	ggtgttgggt	ttggagtcta	tgetgggcac	agctaccctg	tggccattgc	1080
ttctggctat	cacagtactc	cctgctctcc	tgcagctgct	tctgttgccc	ttctgtcctg	1140
agagcccccg	atacctctac	atcatccgga	acctggaggg	gcctgcccga	aagagtctaa	1200
agcgcctgac	aggctgggct	gatgtgtctg	atgcactggc	tgagctgaag	gatgagaaac	1260
ggaagtggga	aagagagcgt	ccactgtcct	tgctgcagct	cctgggcagc	cgcaccacc	1320
ggcagcctct	gattattgca	gtggtgctgc	agctgagcca	gcagctctca	ggcatcaatg	1380
ctgttttcta	ctattcaacc	agcatctttg	agttagctgg	ggtggaacag	ccagcctacg	1440
ccaccatagg	agctggtgtg	gtcaataccg	tcttcacggt	ggtctcggtg	ctcttagtag	1500
agcgagctgg	gcgacggaca	ctccatctcc	tgggcctggc	aggcatgtgt	ggctgtgcca	1560
tcttgatgac	ggtggctctg	ctgctgctgg	agcgggttcc	atccatgagt	tatgtgtcca	1620
tcgtggccat	atttggcttt	gtggccttct	ttgagattgg	tcctggcccc	atcccctggt	1680
tcattgtggc	cgagctcttc	agccagggcc	cccgcaccgc	agccatggct	gtagctgggt	1740
tctccaactg	gacctgtaac	ttcatcgttg	gcattgggtt	ccagtatgtt	gcggatgcta	1800
tgggtcccta	cgtcttcctt	ctatttgccg	tcctcctgct	tggcttcttc	atcttcacct	1860
tcctaagagt	gcctgaaacc	agaggccgga	catttgacca	gatctcggcc	accttccgac	1920
ggacaccttc	tctcttagag	caggaggtga	aaccacgtac	agaacttgaa	tacttagggc	1980
cagatgagaa	tgactaatcg	atttgaagtg	agacgtccca	tcatctctct	taatttttca	2040
tgactgacgt	ttttcttcca	ttttaattat	catagtattt	gtttgaaaaa	aaaaaaaaaa	2100
aatttccctt	atcaatgata	tccttacgat	tatataaatt	ccttacctaa	acctattatt	2160
tgtgtacata	tatcagagta	ttattacata	tataaccttt	ttctctaaaa	caggaaaaaa	2220
aaaagaaaaac	gataacatgc	tctgccatcc	tttgttcacc	gagcaaaatt	aaaaacgcaa	2280
aatgaattgt	ccctatgaaa	ttattaaagg	accacatcac	cagacttatc	tctgggggggt	2340
cctctagaaa	ataagtcagg	tacttgcttg	gactttcttc	cagttg		2386

<210> 11

<211> 7777

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

atggagccca	gcagcaagaa	gctgacgggt	cgctcatgc	tggctgtggg	aggagcagtg	60
cttggctccc	tgcagtttgg	ctacaacact	ggagtcatca	atgcccccca	gaagggtgatc	120
gaggagttct	acaaccagac	atgggtccac	cgctatgggg	agagcatcct	gcccaccacg	180
ctcaccacgc	tctggtccct	ctcagtggcc	atcttttctg	ttgggggcat	gattggctcc	240
ttctctgtgg	gccttttctg	taaccgcttt	ggccggcgga	attcaatgct	gatgatgaac	300

ctgctggcct	tctgtgccgc	cgtgctcatg	ggcttctcga	aactgggcaa	gtcctttgag	360
atgtgatcc	tgggcccgtt	catcatcggg	gtgtactgcg	gcctgaccac	aggcttcgtg	420
cccatgtatg	tgggtgaagt	gtcaccacac	gcctttcgtg	gggcccctggg	caccctgcac	480
cagctgggca	tctgctcggg	catcctcatc	gcccaggtgt	tgggcctgga	ctccatcatg	540
ggcaacaagg	actgtgggcc	cctgctgctg	agcatcatct	tcatcccggc	cctgctgcag	600
tgcctcgtgc	tgcccttctg	ccccgagagt	ccccgccttc	tgctcatcaa	ccgcaacgag	660
gagaaccggg	ccaagagtgt	gctaaagaag	ctgcgcggga	cagctgacgt	gacctatgac	720
ctgcaggaga	tgaaggaaga	gagtcggcag	atgatgcggg	agaagaagg	caccatcctg	780
gagctgttcc	gctccccgcg	ctaccgccag	cccatcctca	tctgctgtgg	gctgcagctg	840
tcccagcagc	tgtctggcat	caacgctgtc	ttctattact	ccacgagcat	cttcgagaag	900
gcggggggtg	agcagcctgt	gtatgccacc	attggctccg	gtatcgtcaa	cacggccttc	960
actgtcgtgt	cgtgttttgt	ggtggagcga	gcaggccggc	ggaccctgca	cctcataggc	1020
ctcgtcggca	tggcggggtg	tgccatactc	atgaccatcg	cgctagcact	gctggagcag	1080
ctaccctgga	tgtcctatct	gagcatcgtg	gccatctttg	gctttgtggc	cttctttgaa	1140
gtgggtcctg	gccccatccc	atggttcac	gtggctgaac	tcttcagcca	gggtccacgt	1200
ccagctgcca	ttgccgttgc	aggcttctcc	aactggacct	caaatttcat	tgtgggcatg	1260
tgtctccagt	atgtggagca	actgtgtggt	ccctacgtct	tcatcatctt	cactgtgtct	1320
ctgggtctgt	tcttcatctt	cacctacttc	aaagtctctg	agactaaagg	ccggaccttc	1380
gatgagatcg	cttccggctt	ccggcagggg	ggagccagcc	aaagtataaa	gacaccgag	1440
gagctgttcc	atcccctggg	ggctgattcc	caagtgtgat	aagcttatcg	ataccgtcga	1500
cctcgagtca	tgttaattagt	tatgtcacgc	ttacattcac	gcccctcccc	cacatccgct	1560
ctaaccgaaa	aggaaggagt	tagacaacct	gaagtctagg	tccctattta	tttttttata	1620
gttatgttag	tattaagaac	gttatttata	tttcaaattt	ttcttttttt	tctgtacaga	1680
cgcgtgtacg	catgtaacat	tatactgaaa	accttgcttg	agaaggtttt	gggacgctcg	1740
aaggctttta	tttgccggccg	gtaccaaat	cgccctatag	tgagtcgtat	tacgcgcgct	1800
cactggcgtg	cgttttacaa	cgtcgtgact	gggaaaaccc	tggcgttacc	caacttaatc	1860
gccttgagc	acatccccct	ttcgccagct	ggcgtaatat	cgaagaggcc	cgcaccgatc	1920
gcccctccca	acagttgcgc	agcctgaatg	gcgaatggcg	cgacgcgccc	tgtagcggcg	1980
cattaagcgc	ggcgggtgtg	gtggttacgc	gcagcgtgac	cgctacactt	gccagcggcc	2040
tagcgcgccg	tcccttcgct	ttcttccctt	cctttctcgc	cacgttcgcc	ggctttcccc	2100
gtcaagctct	aaatcggggg	ctccctttag	ggttccgatt	tagtgcttta	cggcacctcg	2160
accccaaaaa	acttgattag	ggtgatggtt	cacgtagtgg	gccatcgccc	tgatagacgg	2220
tttttcgccc	tttgacgttg	gagtcacgt	tctttaatat	tggactcttg	ttccaaactg	2280
gaacaacact	caaccctatc	tgggtctatt	cttttgattt	ataagggatt	ttgccgattt	2340
cggcctattg	gttaaaaaat	gagctgattt	aacaaaaatt	taacgcgaat	tttaacaaaa	2400
tattaacgtt	tacaatttcc	tgatgcggta	ttttctcctt	acgcactctg	gcggtatttc	2460
acaccgcata	gggtaataac	tgatataatt	aaattgaagc	tctaatttgt	gagtttagta	2520
tacatgcatt	tacttataat	acagtttttt	agttttgctg	gcccgcactt	ctcaaatatg	2580
cttcccagcc	tgtttttctg	taacgttcac	cctctacctt	agcatccctt	ccctttgcaa	2640
atagtccctc	tccaacaata	ataatgtcag	atcctgtaga	gaccacatca	tccacgggtc	2700
tatactgttg	acccaatgcg	tctcccttgt	catctaaacc	cacaccgggt	gtcataatca	2760
accaatcgta	accttcactc	cttccaccca	tgtctctttg	agcaataaag	ccgataacaa	2820
aatctttgtc	gctcttcgca	atgtcaacag	tacccttagt	atattctcca	gtagataggg	2880
agcccttgca	tgacaattct	gctaacaatc	aaaggcctct	aggttccctt	gttacttctt	2940
ctgcgcctg	cttcaaaccg	ctaacaatac	ctgggcccac	cacaccgtgt	gcattcgtaa	3000
tgtctgcccc	ttctgtctatt	ctgtatacac	ccgcagagta	ctgcaatttg	actgtattac	3060
caatgtcagc	aaattttctg	tcttcgaaga	gtaaaaaatt	gtacttggcg	gataatgcct	3120
ttagcggctt	aactgtgccc	tccatggaaa	aatcagtcac	gatatccaca	tgtgttttta	3180



gtaaacaaat	tttgggacct	aatgcttcaa	ctaactccag	taattccttg	gtggtacgaa	3240
catccaatga	agcacacaag	tttgtttgct	tttcgtgcat	gatattaaat	agcttggcag	3300
caacaggact	aggatgagta	gcagcacggt	ccttatatgt	agcttttcgac	atgattttatc	3360
ttcgttttct	gcaggttttt	gttctgtgca	gttgggttaa	gaatactggg	caattttcatg	3420
tttcttcaac	actacatatg	cgtatatata	ccaatctaag	tctgtgctcc	ttccttcggt	3480
cttccttctg	ttcggagatt	accgaatcaa	aaaaatttca	aagaaaccga	aatcaaaaaa	3540
aagaataaaa	aaaaaatgat	gaattgaatt	gaaaagctgt	ggtatggtgc	actctcagta	3600
caatctgctc	tgatgccgca	tagttaagcc	agccccgaca	cccgcccaaca	cccgtgacg	3660
cgccctgacg	ggcttgtctg	ctcccgccat	ccgcttacag	acaagctgtg	accgtctccg	3720
ggagctgcat	gtgtcagagg	ttttcaccgt	catcaccgaa	acgcgcgaga	cgaaggggccc	3780
togtgatacg	cctatttttta	taggttaatg	tcataataat	aatgggtttct	tagtatgatc	3840
caatatcaaa	ggaaatgata	gcattgaagg	atgagactaa	tccaattgag	gagtggcagc	3900
atatagaaca	gctaaagggt	agtgtgaag	gaagcatacg	ataccccgca	tggaatggga	3960
taatatacaca	ggaggtacta	gactaccttt	catcctacat	aaatagacgc	atataagtac	4020
gcattttaagc	ataaacacgc	actatgccgt	tcttctcatg	tatatatata	tacaggcaac	4080
acgcagatat	aggtgcgacg	tgaacagtga	gctgtatgtg	cgcagctcgc	gttgcatttt	4140
cgggaagcgt	cgtttttcgga	aacgctttga	agttcctatt	ccgaagtccc	tattctctag	4200
aaagtatagg	aacttcagag	cgcttttgaa	aacccaaaagc	gctctgaaga	cgcacttttca	4260
aaaaacccaaa	aacgcaccgg	actgtaacga	gctactaaaa	tattgcgaat	accgctttcca	4320
caaacattgc	tcaaaagtat	ctctttgcta	tatatctctg	tgctatatcc	ctatataacc	4380
taccatcca	cctttcgcctc	cttgaacttg	catctaaact	cgacctctac	attttttatg	4440
tttatctcta	gtattactct	ttagacaaaa	aaattgtagt	aagaactatt	catagagtga	4500
atcgaaaaca	atacgaaaat	gtaaacattt	cctatacgtg	gtatatagag	acaaaataga	4560
agaaaccggt	cataattttc	tgaccaatga	agaatcatca	acgctatcac	tttctgttca	4620
caaagtatgc	gcaatccaca	tcggtataga	atataatcgg	ggatgccttt	atcttgaaaa	4680
aatgcacccg	cagcttcgct	agtaatcagt	aaacgcggga	agtggagtca	ggcttttttt	4740
atggaagaga	aaatagacac	caaagtagcc	ttcttctaac	cttaacggac	ctacagtgca	4800
aaaagttatc	aagagactgc	attatagagc	gcacaaagga	gaaaaaaagt	aatctaagat	4860
gctttgttag	aaaaatagcg	ctctcgggat	gcatttttgt	agaacaaaaa	agaagtatag	4920
attctttgtt	ggtaaaaatag	cgctctcgcg	ttgcattttct	gttctgtaaa	aatgcagctc	4980
agattctttg	tttgaaaaat	tagcgctctc	gcgttgcat	tttgttttac	aaaaatgaag	5040
cacagattct	tcgttggtaa	aatagcgctt	tcgcgttgca	tttctgttct	gtaaaaatgc	5100
agctcagatt	ctttgtttga	aaaattagcg	ctctcgcgtt	gcatttttgt	tctacaaaat	5160
gaagcacaga	tgcttcgctc	aggtggcact	tttcggggaa	atgtgcgcgg	aacccttatt	5220
tgtttatttt	tctaaataca	ttcaaatatg	tatccgctca	tgagacaata	accctgataa	5280
atgcttcaat	aatattgaaa	aaggaagagt	atgagtattc	aacatttccg	tgctgcctct	5340
attccctttt	ttgcggcatt	ttgccttctc	gtttttgtct	accagaaac	gctggtgaaa	5400
gtaaaagatg	ctgaagatca	gttgggtgca	cgagtgggtt	acatcgaact	ggatctcaac	5460
agcggtaaga	tccttgagag	ttttcgcccc	gaagaacgtt	ttccaatgat	gagcactttt	5520
aaagttctgc	tatgtggcgc	ggtattatcc	cgtattgacg	ccgggcaaga	gcaactcggg	5580
cgccgcatac	actattctca	gaatgacttg	gttgagtact	caccagtcac	agaaaagcat	5640
cttacggatg	gcatgacagt	aagagaatta	tgagtgtctg	ccataaccat	gagtataaac	5700
actgcggcca	acttacttct	gacaacgatc	ggaggaccga	aggagctaac	cgtttttttg	5760
cacaacatgg	gggatcatgt	aactcgcctt	gatcgttggg	aaccggagct	gaatgaagcc	5820
ataccaaacg	acgagcgtga	caccacgatg	cctgtagcaa	tggcaacaac	gttgcgcaaa	5880
ctattaactg	gcgaactact	tactctagct	tccgggcaac	aattaataga	ctggatggag	5940
gcggataaag	ttgcaggacc	acttctgcgc	tcggcccttc	cggctggctg	gtttattgct	6000
gataaatctg	gagccggtga	gcgtgggtct	cgcggtatca	ttgcagcact	ggggccagat	6060

ggtaagccct	cccgtatcgt	agttatctac	acgacgggga	gtcaggcaac	tatggatgaa	6120
cgaaatagac	agatcgctga	gatagggtgcc	tcactgatta	agcattggta	actgtcagac	6180
caagtttact	catatatact	ttagattgat	ttaaaacttc	atttttaatt	taaaaggatc	6240
taggtgaaga	tcctttttga	taatctcatg	acaaaaatcc	cttaacgtga	gttttcgttc	6300
cactgagcgt	cagaccccgt	agaaaagatc	aaaggatctt	cttgagatcc	tttttttctg	6360
cgcgtaatct	gctgcttgca	aacaaaaaaa	ccaccgctac	cagcggtggt	ttgtttgccg	6420
gatcaagagc	taccaactct	ttttccgaag	gtaactggct	tcagcagagc	gcagatacca	6480
aatactgtcc	ttctagtgtg	gccgtagtta	ggccaccact	tcaagaactc	tgtagcaccg	6540
cctacatacc	tcgctctgct	aatcctgtta	ccagtggctg	ctgccagtgg	cgataagtcg	6600
tgtcttaccg	ggttggactc	aagacgatag	ttaccggata	aggcgcagcg	gtcgggctga	6660
acgggggggt	cgtgcacaca	gccagcttg	gagcgaacga	cctacaccga	actgagatac	6720
ctacagcgtg	agctatgaga	aagcgccacg	cttcccgaag	ggagaaaggc	ggacaggtat	6780
ccggtaagcg	gcagggctcg	aacaggagag	cgcacgaggg	agcttccagg	gggaaacgcc	6840
tggtatcttt	atagtcctgt	cgggtttcgc	cacctctgac	ttgagcgtcg	atttttgtga	6900
tgctcgtcag	gggggctggag	cctatggaaa	aacgccagca	acgcggcctt	tttacggttc	6960
ctggcctttt	gctggccttt	tgctcacatg	ttctttcctg	cgttatcccc	tgattctgtg	7020
gataaccgta	ttaccgcctt	tgagttagct	gataccgctc	gccgcagccg	aacgaccgag	7080
cgcagcgagt	cagttagcga	ggaagcggaa	gagcgcccaa	tacgcaaacc	gcctctcccc	7140
gcgcgttggc	cgattcatta	atgcagctgg	cacgacaggt	ttcccgaactg	gaaagcgggc	7200
agttagcgcga	acgcaattaa	tgtgagttac	ctcactcatt	aggcacccca	ggctttacac	7260
tttatgcttc	cggctcctat	gttgtgtgga	attgtgagcg	gataacaatt	tcacacagga	7320
aacagctatg	accatgatta	cgccaagcgc	gcaattaacc	ctcactaaag	ggaacaaaag	7380
ctggagctcg	taggaacaat	ttcgggcccc	tgctgtttct	tctgaggttc	atctttttaca	7440
tttgcttctg	ctggataatt	ttcagaggca	acaaggaaaa	attagatggc	aaaaagtcgt	7500
ctttcaagga	aaaatcccca	ccatctttcg	agatcccctg	taacttattg	gcaactgaaa	7560
gaatgaaaag	gaggaaaata	caaaatatac	tagaactgaa	aaaaaaaaag	tataaataga	7620
gacgatatat	gccaataactt	cacaatgttc	gaatctattc	ttcatttgca	gctattgtaa	7680
aataataaaa	catcaagaac	aaacaagctc	aacttgtctt	ttctaagaac	aaagaataaa	7740
cacaaaaaca	aaaagttttt	ttaattttta	tcaaaaa			7777

<210> 12

<211> 2338

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 12

tcgactctag	aggatcccct	taagctaatc	cttatgaatc	cggagaaaag	cggggtcttt	60
taactcaata	aaatttttcg	aaatcctttt	tcctacgcgt	tttcttcggg	aactagatag	120
gtggctcttc	cacctgtttt	tccatcattt	tagtttttcg	caagccatgc	gtgccttttc	180
gtttttgcga	tggcgaacga	gggctggaaa	aattaacggg	acgccgccta	acgatagtaa	240
taggccacgc	aactggcgtg	gacgacaaca	ataagtcgcc	catttttttat	gtttttcaaaa	300
cctagcaacc	cccaccaaac	ttgtcatcgt	tcccggattc	acaaatgata	taaaaagcga	360
ttacaattct	acattctaac	cagatttgag	atttcctctt	tctcaattcc	tcttatatta	420
gattataaga	acaacaaatt	aaattacaaa	aagacttata	aagcaacata	atgtctgaat	480
tcagcaagaa	ggtgacgggc	cgccttatgt	tggccgtggg	aggggcagtg	ctcgatccc	540
tgcagttcgg	ctataacacc	ggtgtcatca	acgcccccca	gaaggtaatt	gaggagtctt	600
acaatcaaac	atggaaccac	cgctatggag	agtccatccc	atccaccaca	ctcaccacac	660

tctgggtctct ctccgtggcc atcttctctg tcgggggcat gattgggtcc ttctctgtgg 720  
gcctctttgt taatcgcttt ggcaggcgga actccatgct gatgatgaac ctgttggcct 780  
ttgtgtctgc cgtgcttatg ggtttctcca aactgggcaa gtcctttgag atgctgatcc 840  
tgggcccgtt catcattgga gtgtactgtg gcctgaccac cggctttgtg cccatgtatg 900  
tgggggaggt gtcaccacaca gctcttcgtg gagccctggg caccctgcac cagctgggca 960  
tcgtcgttgg gatccttatt gccaggtgt tcggcttaga ctccatcatg ggcaatgcag 1020  
acttgtggcc tctactgctc agtgtcatct tcatcccagc cctgctacag tgtatcctgt 1080  
tgcccttctg ccctgagagc ccccgcttcc tgctcatcaa tcgtaacgag gagaaccggg 1140  
ccaagagtgt gctgaaaaag cttcgaggga cagccgatgt gacccgagac ctgcaggaga 1200  
tgaaagaaga gggtcggcag atgatgcggg agaagaaggt caccatcttg gagctgttcc 1260  
gctcaccgc ctaccgccag cccatcctca tcgccgtggt gctgcagctg tcccagcagc 1320  
tgtcgggcat caatgctgtg ttctactact caacgagcat cttcgagaag gcaggtgtgc 1380  
agcagcctgt gtatgccacc atcggctcgg gtatcgtcaa cacggccttc actgtggtgt 1440  
cgctgttcgt cgtggagcga gctggccgtc ggaccctgca tctcattggt ctggctggca 1500  
tggcgggctg tgetgtgctc atgaccatcg ccctggccct gctggagcag ctgccctgga 1560  
tgtcctatct gagtatcgtg gccatctttg gctttgtggc cttctttgaa gtaggccttg 1620  
gtcctattcc atggttcatt gtggccgagc tgttcagcca ggggccccga cctgctgctg 1680  
ttgctgtggc tggcttctct aactggacct caaacttcat cgtgggcatg tgcttccaat 1740  
atgtggagca actgtgtggc cctacgtct tcatcatctt cacggtgctg ctggtactct 1800  
tcttcattct cacctaettc aaagttoctg agaccaaagg ccggaccttc gatgagatcg 1860  
cttcgggctt ccggcagggg ggtgccagcc agagcgacaa gacacctgag gagctcttcc 1920  
accctctggg ggctgactcc caagtgaat cgatttgaag tgagacgctc catcatctct 1980  
cttaattttt catgactgac gttttttctt cattttaatt atcatagtat ttgtttgaaa 2040  
aaaaaaaaaa aaaatttccc ttatcaatga tatccttacg attatataaa ttccttacct 2100  
aaacctatta tttgtgtaca tatatcagag tattattaca tatataacct ttttctctaa 2160  
aacaggaaaa aaaaaagaaa acgataacat gctctgccat cttttgttca ccgagcaaaa 2220  
ttaaaaacgc aaaatgaatt gtccctatga aattattaaa ggaccacatc accagactta 2280  
tctctggggg gtcctctaga aaataagtca ggtacttgcc tggactttct tccagttg 2338

<210> 13

<211> 2338

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 13

tcgactctag aggatcccct taagctaata cttatgaata cggagaaaag cgggggtcttt 60  
taactcaata aaattttccg aaatcctttt tctacgcgt tttcttcggg aactagatag 120  
gtggctcttc cacctgtttt tccatcattt tagtttttcg caagccatgc gtgccttttc 180  
gtttttgcca tggcgaacga gggctggaaa aattaacggt acgccgccta acgatagtaa 240  
taggccacgc aactggcgtg gacgacaaca ataagtcgcc cattttttat gttttcaaaa 300  
cctagcaacc cccaccaaac ttgtcatcgt tcccggattc acaaatagata taaaaagcga 360  
ttacaattct acattctaac cagatttgag atttcctctt tctcaattcc tcttatatta 420  
gattataaga acaacaaatt aaattacaaa aagacttata aagcaacata atgtctgaat 480  
tcagcaagaa ggtgacgggc cgcttatgt tggccgtggg aggggcagtg ctcggatccc 540  
tgcagttcgg ctataacacc ggtgtcatca acgccccca gaaggtaatt gaggagtctt 600  
acaatcaaac atggaaccac cgctatggag agtccatccc atccaccaca ctcaccacac 660  
tctgggtctct ctccatggcc atcttctctg tcgggggcat gattgggtcc ttctctgtgg 720

gcctctttgt taatcgcttt ggcaggcgga actccatgct gatgatgaac ctgttggcct 780  
 ttgtgtctgc cgtgcttatg ggtttctcca aactgggcaa gtcccttgag atgctgatcc 840  
 tgggcccgtt catcattgga gtgtactgtg gcctgaccac cggctttgtg cccatgtatg 900  
 tgggggaggt gtcaccacaca gctcttcgtg gagccctggg caccctgcac cagctgggca 960  
 tcgtcgttgg gatccttatt gccaggtgt tcggcttaga ctccatcatg ggcaatgcag 1020  
 acttgtggcc tctactgctc agtgtcatct tcatcccagc cctgctacag tgtatcctgt 1080  
 tgcccttctg ccctgagagc ccccgcttcc tgctcatcaa tcgtaacgag gagaaccggg 1140  
 ccaagagtgt gctgaaaaag cttcgagggg cagccgatgt gacccgagac ctgcaggaga 1200  
 tgaaagaaga gggtcggcag atgatgcggg agaagaaggt caccatcttg gagctgttcc 1260  
 gctcaccgc ctaccgccag cccatcctca tcgccgtggg gctgcagctg tcccagcagc 1320  
 tgtcgggcat caatgctgtg ttctactact caacgagcat cttcgagaag gcagggtgtgc 1380  
 agcagcctgt gtatgccacc atcggctcgg gtatcgtcaa cacggccttc actgtggtgt 1440  
 cgctgttctg cgtggagcga gctggccgtc ggaccctgca tctcattggg ctggctggca 1500  
 tggcgggctg tgctgtgctc atgaccatcg ccctggccct gctggagcag ctgccctgga 1560  
 tgtcctatct gagtatcgtg gccatctttg gctttgtggc cttctttgaa gtaggccctg 1620  
 gtccatttcc atggttcatt gtggccgagc tgttcagcca ggggccccga cctgctgctg 1680  
 ttgtgtggc tggcttctct aactggacct caaacttcat cgtgggcatg tgcttccaat 1740  
 atgtggagca actgtgtggc ccctacgtct tcatcatctt cacggtgctg ctggtactct 1800  
 tcttcatctt cactacttc aaagttcctg agaccaaagg ccggaccttc gatgagatcg 1860  
 cttccggctt ccggcagggg ggtgccagcc agagcgacaa gacacctgag gagctcttcc 1920  
 accctctggg ggctgactcc caagtgaat cgatttgaag tgagacgctc catcatctct 1980  
 cttaattttt catgactgac gttttttctt cattttaatt atcatagtat ttgtttgaaa 2040  
 aaaaaaaaaa aaaatttccc ttatcaatga tctccttacg attatataaa ttccttacct 2100  
 aaacctatta tttgtgtaca tatatcagag tattattaca tatataacct ttttctctaa 2160  
 aacaggaaaa aaaaaagaaa acgataacat gctctgccat cctttgttca ccgagcaaaa 2220  
 ttaaaaaacgc aaaatgaatt gtccctatga aattattaaa ggaccacatc accagactta 2280  
 tctctggggg gtccctctaga aaataagtca ggtacttgcc tggactttct tccagttg 2338

<210> 14

<211> 2338

<212> DNA

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 14

tcgactctag aggatcccct taagctaate cttatgaate cggagaaaag cgggggtcttt 60  
 taactcaata aaattttccg aaatcctttt tctacgcgt tttcttcggg aactagatag 120  
 gtggctcttc cacctgtttt tccatcattt tagtttttcg caagccatgc gtgccttttc 180  
 gttttttgca tggcgaacga gggctggaaa aattaacggg acgccgccta acgatagtaa 240  
 taggccacgc aactggcgtg gacgacaaca ataagtcgcc cattttttat gttttcaaaa 300  
 cctagcaacc cccaccaaac ttgtcatcgt tcccggattc acaaatagata taaaaagcga 360  
 ttacaattct acattctaac cagatttgag atttctctt tctcaattcc tcttatatta 420  
 gattataaga acaacaaatt aaattacaaa aagacttata aagcaacata atgtctgaat 480  
 tcagcaagaa ggtgacgggc cgccttatgt tggccgtggg aggggcagtg ctccgatccc 540  
 tgcagttcgg ctataacacc ggtgtcatca acgccccca gaaggtaatt gaggagttct 600  
 acaatcaaac atggaaccac cgctatggag agtccatccc atccaccaca ctcaccacac 660  
 tctggctctc ctccgtgatg atcttctctg tcgggggcat gattgggttc ttctctgtgg 720  
 gcctctttgt taatcgcttt ggcaggcgga actccatgct gatgatgaac ctgttggcct 780

ttgtgtctgc cgtgcttatg ggtttctcca aactgggcaa gtcctttgag atgctgatcc 840  
 tgggcccgtt catcattgga gtgtactgtg gcctgaccac cggctttgtg cccatgtatg 900  
 tgggggaggt gtcaccacaca gctcttcgtg gagccctggg caccctgcac cagctgggca 960  
 tcgtcgttgg gatccttatt gccaggtgt tcggcttaga ctccatcatg ggcaatgcag 1020  
 acttgtggcc tctactgctc agtgtcatct tcatccagc cctgctacag tgtatcctgt 1080  
 tgcccttctg ccctgagagc ccccgcttcc tgctcatcaa tcgtaacgag gagaaccggg 1140  
 ccaagagtgt gctgaaaaag cttcgaggga cagccgatgt gacccgagac ctgcaggaga 1200  
 tgaaagaaga gggctggcag atgatgctgg agaagaaggt caccatcttg gagctgttcc 1260  
 gctcaccgc ctaccgccag cccatcctca tcgctgtgtg gctgcagctg tcccagcagc 1320  
 tgtcgggcat caatgctgtg ttctactact caacgagcat cttcgagaag gcagggtgtg 1380  
 agcagcctgt gtatgccacc atcggtctgg gtatcgtcaa caggcccttc actgtgggtg 1440  
 cgctgttctg cgtggagcga gctggccgtc ggaccctgca tctcattggt ctggctggca 1500  
 tggcgggctg tgctgtgctc atgaccatcg ccctggccct gctggagcag ctgcctgga 1560  
 tgtcctatct gagtatcgtg gccatctttg gctttgtggc cttctttgaa gtaggccctg 1620  
 gtcctattcc atggttcatt gtggccgagc tgctcagcca ggggccccga cctgctgctg 1680  
 ttgctgtggc tggcttctct aactggacct caaacttcat cgtgggcatg tgcttccaat 1740  
 atgtggagca actgtgtggc ccctacgtct tcatcatctt cagggtgctg ctgggtactct 1800  
 tcttcatctt cacctacttc aaagtctctg agaccaaagg ccggaccttc gatgagatcg 1860  
 cttccggctt ccggcagggg ggtgccagcc agagcgacaa gacacctgag gagctcttcc 1920  
 accctctggg ggctgactcc caagtgtaat cgatttgaag tgagacgctc catcatctct 1980  
 cttaattttt catgactgac gttttttctt cattttaatt atcatagtat ttgtttgaaa 2040  
 aaaaaaaaaa aaaatttccc ttatcaatga tctccttacg attatataaa ttctttacct 2100  
 aaacctatta tttgtgtaca tatatcagag tattattaca tatataacct ttttctctaa 2160  
 aacaggaaaa aaaaaagaaa acgataacat gctctgccat cctttgttca ccgagcaaaa 2220  
 ttaaaaacgc aaaatgaatt gtccctatga aattattaaa ggaccacatc accagactta 2280  
 tctctggggg gtcctctaga aaataagtca ggtacttgcc tggactttct tccagttg 2338

<210> 15

<211> 6360

<212> DNA

<213> Vektor

<400> 15

cgtaggaaca atttcgggccc cctgctgtgtt cttctgaggt tcatctttta catttgcttc 60  
 tgctggataa ttttcagagg caacaaggaa aaattagatg gcaaaaagtc gtctttcaag 120  
 gaaaaatccc caccatcttt cgagatcccc tgtaacttat tggcaactga aagaatgaaa 180  
 aggaggaaaa tacaaaaatat actagaactg aaaaaaaaaa agtataaata gagacgatat 240  
 atgccaatat ttcacaatgt tcgaatctat tcttcatttg cagctattgt aaaataataa 300  
 aacatcaaga acaaaacaagc tcaacttgct ttttctaaga acaaagaata aacacaaaaa 360  
 caaaaagttt ttttaatttt aatcaaaaag ttaacatgca tcaccatcac catcacacta 420  
 gtggatcccc cgggctgcag gaattcgata tcaagcttat cgataccgtc gacctcgagt 480  
 catgtaatta gttatgtcac gcttacattc acgcccctccc cccacatccg ctctaaccga 540  
 aaaggaagga gtttagacaac ctgaagtcta ggtccctatt tattttttta tagttatgtt 600  
 agtattaaga acgttatatta tatttcaaat ttttcttttt tttctgtaca gacgcgtgta 660  
 cgcagtgaac attatactga aaaccttgct tgagaagggt ttgggacgct cgaaggcttt 720  
 aatttgcggc cggtagccaa ttgcctctat agtgagtcgt attacgcgcg ctactggcc 780  
 gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcgtta cccaacttaa tcgccttgca 840

gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc 900  
caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg cgcgacgcgc cctgtagcgg cgcattaagc 960  
gcggcgggtg tgggtggttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc cctagcgcgc 1020  
gtctctttcg ctttcttccc ttcttttctc gccacgttcg ccggctttcc ccgtcaagct 1080  
ctaaatcggg ggctcccttt agggttccga tttagtgtt tacggcacct cgaccccaaa 1140  
aaacttgatt aggggtgatgg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac ggtttttctgc 1200  
cctttgacgt tggagtccac gttctttaat agtggactct tgttccaaac tggaaacaaca 1260  
ctcaacccta tctcgggtcta ttcttttgat ttataaggga ttttgccgat ttcggcctat 1320  
tgggttaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga attttaacaa aatattaacg 1380  
tttacaattt cctgatgcgg tatttttctcc ttacgcactc gtgcgggtatt tcacaccgca 1440  
tagggtaata actgatataa ttaaattgaa gctctaattt gtgagtttag tatacatgca 1500  
tttacttata atacagtttt ttagttttgc tggccgcac ttctcaaata tgcttcccag 1560  
cctgcttttc tgaacgttc accctctacc ttagcatccc ttccctttgc aaatagtcct 1620  
cttccaacaa taataatgtc agatcctgta gagaccacat catccacggt tctatactgt 1680  
tgaccaaatg cgtctccctt gtcactctaa cccacaccgg gtgtcataat caaccaatcg 1740  
taaccttcat ctcttccacc catgtctctt tgagcaataa agccgataac aaaatctttg 1800  
tcgctcttcg caatgtcaac agtaccctta gtatattctc cagtagatag ggagcccttg 1860  
catgacaatt ctgctaacat caaaaggcct ctaggttcct ttgttacttc ttctgccgcc 1920  
tgcttcaaac cgctaacaat acctgggccc accacaccgt gtgcattcgt aatgtctgcc 1980  
cattctgcta ttctgtatac acccgagag tactgcaatt tgactgtatt accaatgtca 2040  
gcaaattttc tgtcttcgaa gagtaaaaaa ttgtacttgg cggataatgc ctttagcggc 2100  
ttaactgtgc cctccatgga aaaatcagtc aagatatcca catgtgtttt tagtaaaaaa 2160  
atthtgggac ctaatgcttc aactaactcc agtaattcct tgggtggtacg aacatccaat 2220  
gaagcacaca agtttgtttg cttttcgtgc atgatattaa atagcttggc agcaacagga 2280  
ctaggatgag tagcagcacg ttctttatat gtagctttcg acatgattta tcttcgtttc 2340  
ctgcagggtt ttgttctgtg cagttgggtt aagaatactg ggcaatttca tgtttcttca 2400  
acactacata tgcgtatata taccaatcta agtctgtgct ccttcttcg ttcttcttcc 2460  
tgttcggaga ttaccgaatc aaaaaattt caaagaaacc gaaatcaaaa aaaagaataa 2520  
aaaaaaaatg atgaattgaa ttgaaaagct gtggtatggt gcactctcag tacaatctgc 2580  
tctgatgccg catagttaag ccagccccga ccccgccaa caccgctga cgcgcctga 2640  
cgggcttgtc tgctcccggc atccgcttac agacaagctg tgaccgtctc cgggagctgc 2700  
atgtgtcaga ggttttcacc gtcactaccg aaacgcgcga gacgaaaggg cctcgtgata 2760  
cgcctatttt tataggttaa tgtcatgata ataattggtt cttagtatga tccaatatca 2820  
aaggaaatga tagcattgaa ggatgagact aatccaattg aggagtggca gcatatagaa 2880  
cagctaaagg gtagtgctga aggaagcata cgataccccg catggaatgg gataatatca 2940  
caggaggtag tagactacct ttcactctac ataaatagac gcatataagt acgcatttaa 3000  
gcataaacac gcactatgcc gttcttctca tgtatatata tatacaggca acacgcagat 3060  
atagggtgca cgtgaacagt gagctgtatg tgcgcagctc gcgttgctatt ttcggaagcg 3120  
ctcgttttcg gaaacgcttt gaagtctcta ttccgaagtt cctattctct agaaagtata 3180  
ggaacttcag agcgcttttg aaaacaaaaa gcgctctgaa gacgcacttt caaaaaacca 3240  
aaaacgcacc ggactgtaac gagtactaa aatattgcga ataccgcttc cacaacatt 3300  
gtcctaaaag atctctttgc tatatatctc tgtgctatat ccctatataa cctacccatc 3360  
cacctttctc tcttgaact tgcactctaa ctcgacctct acatttttta tgtttatctc 3420  
tagtattact ctttagacaa aaaaattgta gtaagaacta ttcatagagt gaatcgaaaa 3480  
caatacgaaa atgtaaacat ttctatacgt tagtatatag agacaaaata gaagaaaccg 3540  
ttcataattt tctgaccaat gaagaatcat caacgctatc actttctgtt cacaagtat 3600  
gcgcaatcca catcgggtata gaataatac ggggatgcct ttatcttgaa aaaatgcacc 3660  
cgcagcttcg ctagtaatca gtaaacgcgg gaagtggagt caggcttttt ttatggaaga 3720

gaaaaatagac	accaaagtag	ccttcttcta	accttaacgg	acctacagtg	caaaaagtta	3780
tcaagagact	gcattataga	gcgcacaaag	gagaaaaaaa	gtaatctaag	atgctttggt	3840
agaaaaatag	cgctctcggg	atgcattttt	gtagaacaaa	aaagaagtat	agattctttg	3900
ttggtaaaat	agcgctctcg	cgttgcattt	ctgttctgta	aaaatgcagc	tcagattctt	3960
tgtttgaaaa	attagcgctc	tcgcgttgca	tttttgtttt	acaaaaatga	agcacagatt	4020
cttcgttggt	aaaatagcgc	tttcgcgttg	catttctggt	ctgtaaaaaat	gcagctcaga	4080
ttctttgttt	gaaaaattag	cgctctcgcg	ttgcattttt	gttctacaaa	atgaagcaca	4140
gatgcttcgt	tcagggtggc	cttttcgggg	aaatgtgcgc	ggaaccccta	tttgtttatt	4200
tttctaata	cattcaata	tgtatccgct	catgagacaa	taaccctgat	aaatgcttca	4260
ataatattga	aaaaggaaga	gtatgagtat	tcaacatttc	cgtgtcgccc	ttattccctt	4320
ttttgcggca	ttttgccttc	ctgtttttgc	tcaccagaa	acgctggtga	aagtaaaaga	4380
tgctgaagat	cagttgggtg	cacgagtggg	ttacatcgaa	ctggatctca	acagcggtaa	4440
gatccttgag	agttttcgcc	ccgaagaacg	ttttccaatg	atgagcactt	ttaaagttct	4500
gctatgtggc	gcggtattat	cccgtattga	cgccgggcaa	gagcaactcg	gtcgccgcat	4560
acactattct	cagaatgact	tggttgagta	ctcaccagtc	acagaaaagc	atcttacgga	4620
tggcatgaca	gtaagagaat	tatgcagtgc	tgccataacc	atgagtgata	acactgcggc	4680
caacttactt	ctgacaacga	tcggaggacc	gaaggagcta	accgcttttt	tgcacaacat	4740
gggggatcat	gtaactcgcc	ttgatcgttg	ggaaccggag	ctgaatgaag	ccataccaaa	4800
cgacgagcgt	gacaccacga	tgccctgtagc	aatggcaaca	acgttgcgca	aactattaac	4860
tggcgaaacta	cttactctag	cttcccggca	acaattaata	gactggatgg	aggcggataa	4920
agttgcagga	ccacttctgc	gctcggccct	tccggtggc	tggtttattg	ctgataaatc	4980
tggagccggt	gagcgtgggt	ctcgcggtat	cattgcagca	ctggggccag	atggtaagcc	5040
ctcccgtatc	gtagttatct	acacgacggg	gagtcaggca	actatggatg	aacgaaatag	5100
acagatcgct	gagataggtg	cctcactgat	taagcattgg	taactgtcag	accaagttta	5160
ctcatatata	ctttagattg	atttaaaact	tcatttttaa	tttaaaagga	tctaggtgaa	5220
gatccttttt	gataatctca	tgacccaaat	cccttaacgt	gagttttcgt	tccactgagc	5280
gtcagacccc	gtagaaaaga	tcaaaggatc	ttcttgagat	cctttttttc	tgcgcgtaat	5340
ctgctgcttg	caaacaaaaa	aaccaccgct	accagcggtg	gtttgtttgc	cggatcaaga	5400
gctaccaact	ctttttccga	aggtaactgg	cttcagcaga	gcgcagatac	caaatactgt	5460
ccttctagt	tagccgtagt	taggccacca	cttcaagaac	tctgtagcac	cgctacata	5520
cctcgctctg	ctaatectgt	taccagtggc	tgctgccagt	ggcgataagt	cgtgtcttac	5580
cgggttggtg	tcaagacgat	agttaccgga	taaggcgag	cggtcgggct	gaacgggggg	5640
ttcgtgcaca	cagcccagct	tggagcgaac	gacctacacc	gaactgagat	acctacagcg	5700
tgagctatga	gaaagcgcca	cgcttcccga	agggagaaa	gcggacaggt	atccggtaag	5760
cggcagggtc	ggaacaggag	agcgcacgag	ggagcttcca	gggggaaacg	cctggtatct	5820
ttatagtcct	gtcgggtttc	gccacctctg	acttgagcgt	cgatttttgt	gatgctcgtc	5880
aggggggctg	agcctatgga	aaaacgccag	caacgcggcc	tttttacggt	tcctggcctt	5940
ttgctggcct	tttgctcaca	tgttctttcc	tgcgttatcc	cctgattctg	tggataaccg	6000
tattaccgcc	tttgagttag	ctgataccgc	tcgccgcagc	cgaacgaccg	agcgcagcga	6060
gtcagttagc	gaggaagcgg	aagagcgccc	aatacgcaaa	ccgcctctcc	ccgcgcgttg	6120
gccgattcat	taatgcagct	ggcacgacag	gtttcccgac	tggaaaagcgg	gcagttagcg	6180
caacgcaatt	aatgtgagtt	acctcactca	ttaggcaccc	caggctttac	actttatgct	6240
tccggctcct	atgttggtg	gaattgtgag	cggataacaa	tttcacacag	gaaacagcta	6300
tgaccatgat	tacgccaagc	gcgcaattaa	ccctcactaa	agggaaacaaa	agctggagct	6360

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 16

ctttctcaat tctcttata ttag

24

<210> 17

<211> 36

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 17

cccgcagag aagatcatca cggagagaga ccagag

36

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 18

aacgtcagtc atgaaaaatt aaga

24